



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**Centro de Ciencias Básicas**

**Departamento de Química**

**Tesis**

**Análisis de la eficiencia de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* en la propagación  
de Agaves**

**Presenta**

**Lic. en Biología Florencia Ontiveros Villa**

**Para obtener el grado de Maestra en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal**

**Tutor**

**Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch**

**Comité tutorial**

**Dr. Juan Jáuregui Rincón**

**M.C. María de Lourdes de la Rosa Carrillo**

**Aguascalientes, Ags, a Enero de 2013**



UNIVERSIDAD AUTONOMA  
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

BIOL. FLORENCIA ONTIVEROS VILLA  
ALUMNO (A) DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN EL  
ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.  
P R E S E N T E .

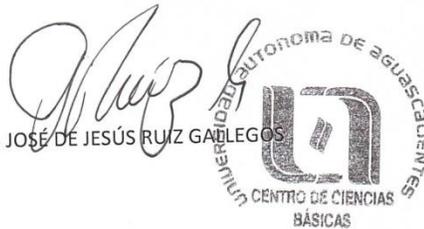
Estimado (a) alumno (a) Ontiveros:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"Análisis de la eficiencia de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* en la propagación de Agaves"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE  
Aguascalientes, Ags., 26 de noviembre de 2012  
"SE LUMEN PROFERRE"  
EL DECANO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS



c.c.p.- Archivo  
JJRG,mjda





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES



M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos  
Decano del Centro de Ciencias Básicas  
PRESENTE:

Estimado M. en C. Ruíz Gallegos:

Por este medio le comunico que la **Biol. Florencia Ontiveros Villa**, egresada de la Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente tanto su trabajo de tesis, como el escrito derivado del mismo. El título de su proyecto fue: "Análisis de la eficiencia de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* en la propagación de Agaves".

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, así como las correcciones hechas al mismo, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder a su impresión definitiva y al examen de grado.

ATENTAMENTE  
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 22 de noviembre de 2012

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'E. Pérez Molphe Balch'.

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch  
Tutor de Tesis  
Departamento de Química  
Centro de Ciencias Básicas





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos**  
**Decano del Centro de Ciencias Básicas**  
**PRESENTE:**

Estimado M. en C. Ruíz Gallegos:

Por este medio le comunico que la **Biol. Florencia Ontiveros Villa**, egresada de la Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente tanto su trabajo de tesis, como el escrito derivado del mismo. El título de su proyecto fue: "Análisis de la eficiencia de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* en la propagación de Agaves".

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, así como las correcciones hechas al mismo, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder a su impresión definitiva y al examen de grado.

ATENTAMENTE  
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 22 de noviembre de 2012

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juan Jáuregui Rincón'.

Dr. Juan Jáuregui Rincón  
Asesor de Tesis  
Departamento de Ingeniería Bioquímica  
Centro de Ciencias Básicas





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

M. en C. José de Jesús Ruíz Gallegos  
Decano del Centro de Ciencias Básicas  
P R E S E N T E :

Estimado M. en C. Ruíz Gallegos:

Por este medio le comunico que la **Biol. Florencia Ontiveros Villa**, egresada de la Maestría en Ciencias en el Área de Biotecnología Vegetal, ha concluido satisfactoriamente tanto su trabajo de tesis, como el escrito derivado del mismo. El título de su proyecto fue: "Análisis de la eficiencia de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* en la propagación de Agaves".

Asimismo, le informo que después de revisar el escrito, así como las correcciones hechas al mismo, considero que ya se tiene una versión final satisfactoria y se puede proceder a su impresión definitiva y al examen de grado.

ATENTAMENTE  
"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 22 de noviembre de 2012

A handwritten signature in cursive script, reading "Laura María de Lourdes de la Rosa Carrillo".

M.C. Laura María de Lourdes de la Rosa Carrillo  
Comité Tutorial  
Departamento de Química  
Centro de Ciencias Básicas



## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por haberme brindado el apoyo económico para continuar mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por haberme dado la oportunidad de estudiar la Maestría en esta Institución así como haberme brindado los recursos necesarios para llevarla a cabo.

A mi tutor, el Doctor Eugenio Pérez Molphe Balch por haberme brindado su confianza, su asesoría, compartir sus conocimientos y facilitarme los recursos necesarios para poder realizar satisfactoriamente la Tesis de Maestría

A mi Comité tutorial, el Doctor Juan Jáuregui Rincón y la M. en C. María de Lourdes de la Rosa Carrillo por su disposición, paciencia y consejos que me brindaron en el desarrollo de la Tesis

DEDICATORIAS

*A Dios*

*A mi Familia por apoyarme, por estar conmigo en los momentos más difíciles así como en los momentos más hermosos de mi vida, por la comprensión y el cariño, así como los valores y la disciplina que han inculcado en mi persona.*

*A mis amigos por brindarme su amistad, su tiempo, comprensión y compartir sus gustos y conocimientos.*

*A mis compañeros de posgrado y de laboratorio por el tiempo que convivimos, que trabajamos juntos, que compartimos y disfrutamos.*

ÍNDICE GENERAL

Autorizaciones	
Agradecimientos	
Dedicatorias	
Índice General	1
Índice de Tablas	4
Índice de Figuras	5
Resumen	8
Abstract	9
1.Introducción	10
2.Marco Téorico	11
2.1. Antecedentes sobre el género <i>Agave</i>	11
Descripción Botánica	11
Metabolismo	16
Distribución y ecología	16
Clasificación	17
Situación actual (especies amenazadas)	18
Usos	18
2.2. Sistemas de propagación <i>in vitro</i> de plantas	20
Descripción general del cultivo de tejidos vegetales y la micropropagación	20
Etapas de la micropropagación	25
Tipos de Biorreactores para el cultivo de plantas	27
Sistemas de inmersión temporal y algunos ejemplos de su eficiencia con	28
diversas especies de plantas	
2.3. Antecedentes sobre la propagación <i>in vitro</i> de Agaves	31
3. Justificación	33
4. Hipótesis	33
5. Objetivos	34
Objetivo General	34
Objetivos Específicos	34
6. Metodología	35
6.1. Propagación <i>in vitro</i> mediante método convencional	35

1.1. Material vegetal	35
1.2. Preparación de Medio de Cultivo MS	35
1.3. Proliferación de los brotes en medio de cultivo <i>in vitro</i> convencional	36
6.2. Propagación de tres especies de <i>Agave</i> en Sistema comercial de inmersión temporal	37
2.1. Material vegetal	37
2.2. Proliferación de los brotes en Sistema de Inmersión Temporal (RITA®)	37
6.3. Propagación de tres especies de <i>Agave</i> en Sistema de Inmersión temporal alternativo	38
3.1. Material vegetal	39
3.2. Preparación de medio de Cultivo MS	39
3.3. Construcción del Sistema de Inmersión Temporal alternativo y montaje del Sistema	39
6.4. Análisis de la eficiencia de los sistemas probados en cuanto a número de plantas que se generan, calidad de las plantas, tiempo y costo.	41
6.5 Propagar una especie de <i>Agave</i> en Inmersión completa	42
5.1. Material vegetal	42
5.2. Preparación de Medio de Cultivo MS	42
5.3. Material	42
5.4 Proliferación de los brotes en Inmersión completa	42
7. Resultados	43
7.1. Multiplicación de brotes en medio de cultivo <i>in vitro</i> convencional	43
7.2. Propagación de tres especies de <i>Agave</i> en un sistema comercial de inmersión temporal	54
7.3. Construir un Sistema alternativo de inmersión temporal y probar su eficiencia con tres especies de <i>Agave</i>	67
7.4. Propagar la especie <i>Agave potatorum</i> en Inmersión completa	75
7.5. Análisis de la calidad de plantas, tiempo y número de plantas que se generaron en los sistemas de cultivo con medio semisólido y los sistemas de inmersión temporal	80
7.6. Análisis de costos de reactivos y material utilizado en los sistemas de cultivo con medio semisólido y los sistemas de inmersión temporal.	82

8. Discusiones	85
9. Conclusiones	91
10. Bibliografía	92



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros y número de especies que forman la familia Agavaceae sensu	17
Tabla 2. Especies de <i>Agave</i> y reguladores de crecimiento vegetal utilizados	36
Tabla 3. Resultados del experimento de micropropagación de <i>Agave</i> mediante cultivo <i>in vitro</i> convencional	44
Tabla 4. Brotes por explante obtenidos de las tres repeticiones realizadas para cada especie de <i>Agave</i> en cultivo <i>in vitro</i> convencional	45
Tabla 5. Resultados del experimento de micropropagación de <i>Agave</i> con biorreactores de inmersión temporal RITA®	63
Tabla 6. Comparación de los tres métodos utilizados para la propagación <i>in vitro</i> de las especies <i>A. potatorum</i> , <i>A. salmiana</i> y <i>A. difformis</i>	80
Tabla 7. Costo de reactivos y algunos materiales utilizados en el sistema de cultivo <i>in vitro</i> convencional	82
Tabla 8. Costo de reactivos y algunos materiales utilizados en el sistema de cultivo <i>in vitro</i> con biorreactor RITA®	83
Tabla 9. Costo de reactivos y algunos materiales utilizados en el sistema de cultivo <i>in vitro</i> con biorreactor alterno	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustración de maguey	15
Figura 2. Ilustración siembra de <i>agaves</i>	20
Figura 3. Dirección de cortes para obtener los segmentos basales de <i>Agave</i>	37
Figura 4. Construcción de un Sistema de Inmersión Temporal alterno	41
Figura 5. Resultados de los experimentos de propagación en <i>Agave bracteosa</i> , <i>A. celsii</i> , <i>A. chiapensis</i> , <i>A. cupreata</i>	46
Figura 6. Resultados de los experimentos de propagación en <i>Agave difformis</i> , <i>A. funkiana</i> , <i>A. karwinskii</i> , <i>A. nizandensis</i>	47
Figura 7. Resultados de los experimentos de propagación en <i>Agave obscura</i> , <i>A.</i> <i>ornithobroma</i> , <i>A. palmeri</i> , <i>A. peacockii</i>	48
Figura 8. Resultados de los experimentos de propagación en <i>A. potatorum</i> , <i>A.</i> <i>salmiana</i> , <i>A. titanota</i> , <i>A. victoria-reginae</i> y <i>A. vizcainoensis</i>	49
Figura 9. Resultados de los experimentos de las tres repeticiones realizadas a través de método de cultivo <i>in vitro</i> convencional de todas las especies	50
Figura 10. Generación de brotes en explantes basales cultivados en medio con citocininas en <i>A. bracteosa</i> , <i>A. celsii</i> , <i>A. chiapensis</i> , <i>A. cupreata</i>	51
Figura 11. Generación de brotes en explantes basales cultivados en medio con citocininas en <i>A. difformis</i> , <i>A. funkiana</i> , <i>A. karwinskii</i> , <i>A. nizandensis</i> , <i>A.</i> <i>obscura</i> , <i>A. ornithobroma</i> , <i>A. palmeri</i> , <i>A. peacockii</i>	52
Figura 12. Generación de brotes en explantes basales cultivados en medio con citocininas en <i>A. potatorum</i> , <i>A. salmiana</i> , <i>A. titanota</i> , <i>A. victoria-reginae</i> , <i>A.</i> <i>vizcainoensis</i>	53
Figura 13. Resultados de los experimentos de propagación en Sistema RITA® para las especies <i>A. potatorum</i> , <i>A. salmiana</i> y <i>A. difformis</i> , con inmersión de 5 minutos cada 12 horas	55
Figura 14. Resultados de los experimentos de propagación en Sistema RITA® para las especies <i>A. potatorum</i> , <i>A. salmiana</i> y <i>A. difformis</i> , con inmersión de 10 minutos cada 6 horas	56
Figura 15. Resultados de los experimentos de propagación en Sistema RITA® para las especies <i>A. potatorum</i> , <i>A. salmiana</i> y <i>A. difformis</i> , con inmersión de 15 minutos cada 3 horas	57

Figura 16. Resultados de los experimentos de propagación en Sistema RITA® para las especies <i>A. potato</i> , <i>A. salmiana</i> y <i>A. difformis</i> , con inmersión de 20 minutos cada 8 horas	57
Figura 17. Explantes de <i>A. difformis</i> y <i>A. potato</i> , se utilizó biorreactor RITA® con inmersión de 5 minutos cada 12 horas	59
Figura 18. Plantas de <i>A. potato</i> , <i>A. difformis</i> y <i>A. salmiana</i> se utilizó biorreactor RITA® con inmersión de 10 minutos cada 6 horas	60
Figura 19. Explantes de <i>A. potato</i> y <i>A. salmiana</i> , se utilizó biorreactor RITA® con inmersión de 15 minutos cada 3 horas	61
Figura 20. Plantas de <i>A. salmiana</i> y <i>A. potato</i> se utilizó biorreactor RITA® con inmersión de 20 minutos cada 8 horas	62
Figura 21. Cinética de aparición de brotes en <i>A. potato</i> en biorreactor RITA® con tiempo de inmersión de 5 minutos cada 12 horas	64
Figura 22. Cinética de aparición de brotes en <i>A. salmiana</i> en biorreactor RITA® con tiempo de inmersión de 5 minutos cada 12 horas	65
Figura 23. Cinética de aparición de brotes en <i>A. difformis</i> en biorreactor RITA® con tiempo de inmersión de 5 minutos cada 12 horas	66
Figura 24. Resultados de los experimentos de propagación en Sistema de Inmersión temporal alterno en <i>A. potato</i> , <i>A. salmiana</i> y <i>A. difformis</i> . Con un tiempo de inmersión de 5 minutos y frecuencia de inmersión cada 24 horas	67
Figura 25. Cinética de aparición de brotes en <i>A. potato</i> , <i>A. salmiana</i> y <i>A. difformis</i> en Sistema de inmersión temporal alterno con tiempo de inmersión de 5 minutos cada 24 horas	68
Figura 26. . Explantes de <i>A. potato</i> , se utilizó Sistema de Inmersión alterno con un tiempo de inmersión de 5 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 24	69
Figura 27. Explantes de <i>A. potato</i> , en Sistema de inmersión temporal alterno después de 50 días con tiempo de inmersión de 5 minutos cada 24 horas	70
Figura 28. Explantes de <i>A. salmiana</i> , se utilizó Sistema de Inmersión Temporal alterno con un tiempo de inmersión de 5 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 24 horas	71
Figura 29. Explantes de <i>A. salmiana</i> , en Sistema de inmersión temporal alterno	72

después de 50 días con tiempo de inmersión de 5 minutos cada 24 horas	
Figura 30. Explantes de <i>A. difformis</i> , se utilizó Sistema de Inmersión Temporal alterno con un tiempo de inmersión de 5 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 24 horas	73
Figura 31. Explantes de <i>A. difformis</i> , en Sistema de inmersión temporal alterno después de 50 días con tiempo de inmersión de 5 minutos cada 24 horas	74
Figura 32. Explantes de <i>A. potatorum</i> en Sistema de inmersión completa. De la primera a la cuarta semana de inmersión	75
Figura 33. Explantes de <i>A. potatorum</i> en Sistema de inmersión completa. De la quinta a la octava semana de inmersión	76
Figura 34. Plantas de <i>A. potatorum</i> después de 50 días obtenidas en Sistema de inmersión completa	76
Figura 35. Resultados de los experimentos de propagación en los distintos sistemas utilizados para <i>A. potatorum</i>	77
Figura 36. Resultados de los experimentos de propagación de los distintos sistemas utilizados para <i>A. salmiana</i> .	78
Figura 37. Resultados de los experimentos de propagación de los distintos sistemas utilizados para <i>A. difformis</i> .	79

# ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *in vitro* EN LA PROPAGACIÓN DE AGAVES.

Florencia Ontiveros Villa

## RESUMEN

Los agaves son uno de los grupos vegetales más representativos de México. Su importancia va desde su valor ecológico y económico, hasta su aspecto cultural. Desafortunadamente, muchas especies de este grupo han sido descuidadas desde los puntos de vista del mejoramiento, explotación racional y conservación. En este sentido, la Biotecnología Vegetal puede aportar herramientas valiosas que permitan el mejor aprovechamiento de estas plantas y aseguren al mismo tiempo su conservación. Se propagaron *in vitro* varias especies mexicanas del género *Agave*, esto a través de métodos convencionales y sistemas de inmersión temporal, con el fin de comparar la eficiencia de ambas metodologías. Se emplearon como explantes meristemos basales de varias especies de *Agave*. De acuerdo a los resultados obtenidos para las 17 especies del género *Agave* utilizando el sistema de cultivo *in vitro* convencional, todas las especies produjeron brotes. Posteriormente se seleccionaron 3 especies las cuales fueron *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis* y se sometieron a Sistemas de Inmersión Temporal RITA® para ser propagadas bajo diferentes tiempos y frecuencias de inmersión. Los tiempos y frecuencias de inmersión utilizados con este Sistema fueron: 5 minutos cada 12 horas, 10 minutos cada 6 horas, 15 minutos cada 3 horas y 20 minutos cada 8 horas. Para la especie *A. potatorum* el tiempo de inmersión de 15 minutos con una frecuencia de inmersión de cada 3 horas fue más efectivo con un promedio de 3.4 brotes por explante. En el caso de las especies *A. salmiana* y *A. difformis* el tiempo de inmersión de cada 5 minutos con una frecuencia de inmersión de cada 12 horas fue efectivo. Se construyó un Sistema de Inmersión Temporal alterno para probar su eficiencia siendo que para las 3 especies de *Agave* seleccionadas si se obtuvo generación de brotes. El método de cultivo *in vitro* convencional resultó ser más eficiente para la proliferación de brotes de las especies *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis* a partir de meristemos basales con un promedio de 4.87, 9.79 y 2.84 respectivamente; en comparación con el método de cultivo utilizando biorreactor RITA® y el Sistema de Inmersión Temporal alterno a los tiempos y frecuencias de inmersión establecidos.

**Analysis of the efficiency of different *in vitro* culture systems in the propagation of Agaves**

**Florencia Ontiveros Villa**

**ABSTRACT**

Agaves are one of the most representative plant groups in Mexico. Its importance goes from its ecological and economic value to its cultural aspect. Unfortunately, many species of this group have been neglected from the point of view of improvement, rational use and conservation. In this sense, the Plant Biotechnology can provide valuable tools that allow the best use of these plants and at the same time ensure their conservation. Were propagated *in vitro* several Mexican species of the genus *Agave*, this through conventional methods and temporary immersion systems in order to compare the efficiency of both methods. Explants were used as basal meristems of several species of *Agave*. According to the results obtained for the 17 species of the genus *Agave* using the conventional system *in vitro* culture, all species were outbreaks. Then were selected 3 species which were *A. potatorum*, *A. salmiana* and *A. difformis* and subjected to temporary immersion Systems RITA® to be propagated under different immersion times and frequencies. The immersion times and frequencies used for this system were: 5 minutes every 12 hours, 10 minutes every 6 hours, 15 minutes every 3 hours and 20 minutes every 8 hours. For the species *A. potatorum* immersion time of 15 minutes with a frequency of immersion every 3 hours was more effective with an average of 3.4 shoots per explant. In case of species *A. salmiana* and *A. difformis* immersion time of 5 minutes and a frequency of immersion every 12 hours was effective. Then was designed an alternative temporary immersion system to test its efficiency, being that for the 3 species of *Agave* selected were outbreaks. The conventional *in vitro* culture method was more efficient for shoot proliferation of species *A. potatorum*, *A. salmiana* and *A. difformis* from basal meristems with an average of 4.87, 9.79 and 2.84 respectively, compared to the method using RITA® and alternative temporary immersion system with times and frequencies of immersion established.

## 1. INTRODUCCIÓN

México es un país privilegiado desde el punto de vista de la diversidad de agaves que posee; es su centro de origen y diversidad natural. Además, como lo señaló en 1982 el gran estudioso de los agaves, el Dr. Howard Scott Gentry, este género rico en usos potenciales cayó en manos de los pueblos que dieron origen al principal centro agrícola de América, resultando en su diversificación explosiva bajo selección y manejo humano. Es esta diversidad, primero generada por la selección natural, y desde hace unos 10,000 años, por la selección humana, la que actualmente estamos disfrutando todos los pobladores de este país y del mundo. Desde la conquista de México, los beneficios que los agaves nos han proporcionado los hemos compartido con el mundo (Colunga, *et al.* 2007).

La biotecnología vegetal tiene como una de sus bases el cultivo de tejidos vegetales, el cual consiste en una serie de técnicas que permiten el cultivo y manipulación, bajo condiciones artificiales y controladas, de células, tejidos y órganos vegetales. Entre las aplicaciones del cultivo de tejido vegetal se puede mencionar la micropropagación o clonación *in vitro* de plantas. La propagación *in vitro* de tejidos es una factible opción alternativa para la rápida multiplicación y mantenimiento del germoplasma (Pérez, *et al.* 1999). Berthouly y Etienne (2005), consideran que la propagación masiva de plantas por cultivo de tejidos es una labor intensiva. Recientemente se han desarrollado sistemas alternos para la propagación masiva de plantas *in vitro*. Los biorreactores y sistemas de inmersión temporal son ejemplos de estas nuevas tecnologías. Los efectos positivos de la inmersión temporal en micropropagación están indicados para la proliferación de brotes y microtallos, microtuberización y embriogénesis somática. El tiempo de inmersión, es decir la duración o frecuencia, es el parámetro más crítico para la eficiencia del sistema.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **II.1. ANTECEDENTES SOBRE EL GÉNERO AGAVE**

#### *Descripción Botánica*

Los agaves son plantas muy decorativas, todas terrestres, con tallo corto o inexistente. Las hojas, duras y carnosas, forman rosetas que alcanzan dimensiones relativamente grandes en diámetro y altura. Son puntiagudas, generalmente con márgenes dentados y en muchas ocasiones terminando en una dura espina terminal. La inflorescencia es un largo escapo, que según la especie puede alcanzar hasta 8 m de altura, que posee numerosas flores agrupadas en espiga o racimo, algunas tardan cien años en florecer y mueren después de fructificar (Rivas, 1996).

#### La Roseta

Los Agaves pueden ser considerados como rosetas perenes ya que requieren varios años para crecer y florecer. Se presentan como plantas gigantes que crecen y florecen pero una vez como una planta anual. El crecimiento y la acumulación de reservas avanzan juntos por un período de 8 a 20 años, hasta que se desarrolla lo suficiente para abrir el meristemo apical y enviar una superestructura efímera, la inflorescencia. La floración dreña las hojas que se marchitan y las semillas secas así como los bulbillos maduros. Si la transición de flores a semillas, funciona mal, la planta recurre a la formación de los bulbillos o brotes que forman pequeñas plantas con una función aproximadamente igual a la de las semillas (Gentry, 1982).

Aquellas especies que florecen una vez en el ápice o cogollo son llamadas monocarpicas o multianuales. Aquellas que florecen en los meristemos laterales de las hojas, a los lados al eje principal, son llamadas policarpicas o perenes. Otras con tallos ramificados se reconocen como plantas policarpicas o arborescentes perenes, produciendo varias rosetas monocarpicas, las rosetas se secan después de la floración. Algunas son en realidad arborescentes y desarrollan tallos, como *A. karwinskyi* Zucc. y *A. goldmaniana* Trel. Con la edad el tallo se reclina en el suelo y se forman nuevas raíces en el área en contacto con el suelo. Las viejas rosetas florecen y se secan, las rosetas más jóvenes

siguen creciendo, se ramifican y enraízan cuando la planta se inclina tocando el suelo formando una clona. Las clonas pueden cubrir varios cientos de metros cuadrados dando la apariencia de plantas individuales. Muchos de los agaves cultivados comercialmente son clones, reproduciéndose por brotes rizomatosos y bulbillos de la inflorescencia. Algunos son poliploides estériles que rara vez o nunca establecen semillas viables. *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber se encuentran entre estos. En muchas especies los brotes rizomatosos se desarrollan por arriba del nivel de las raíces en la base de las hojas, otras especies raramente o nunca proliferan como brotes. Algunas especies desarrollan brotes solo cuando las rosetas son jóvenes, mientras otras pueden desarrollarlos en toda su vida, y otras producirán brotes solo al final de la maduración de la inflorescencia. Sin embargo, la mayoría de las poblaciones silvestres de agave forman semillas, algunas veces en conjunto con bulbillos o con brotes inferiores, para que tanto la reproducción sexual y asexual esté disponible. Las flores ornitófilas y protandras indican exogamia, pero algunas plantas han demostrado tener autofertilidad como *A. funkiana* Koch and Bouche (Gentry, 1982).

Muchos agaves aparecen como sésiles o rosetas acaules. Otras pueden ser acaules o caulescentes dependiendo de las condiciones ambientales. La roseta del agave también es una forma de defensa. La rigidez aguda de las espinas y dientes hace que los animales más grandes se alejen (Gentry, 1982).

#### Las Hojas

Las hojas de *Agave* están dispuestas en espiral. Son generalmente gruesas y suculentas, pero hay pocas especies de hoja dura como *A. striata*. Después de la etapa de germinación la plántula requiere de varios años para formar el cono central o cogollo. Este proceso se caracteriza por el empalme de las hojas, que requiere de tiempo para su maduración y desenvolvimiento sucesivo, dejando en las más externas una marca o impresión sobre el envés de la hoja con la que tiene contacto directo, dándole un aspecto particular a la roseta, esta marca perdura por varios años hasta que la planta muere. Una de las funciones de los nutrientes almacenados y eventualmente consumidos para desarrollar la inflorescencia, se origina de las hojas principalmente y del parénquima inmediato con el que están conectadas. En la hoja de la mayoría de las especies, se entrelazan hileras de numerosos haces vasculares gruesas, desde la base de la hoja hasta la espina terminal, haciendo contacto con las espinas en los márgenes de las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pencas. Algunas de estas fibras son recursos económicamente importantes: *A. sisalana*, *A. fourcroydes*. Mientras las hojas estén túrgidas se mantendrán con la edad, rectas y ascendentes o en forma horizontal, pero en períodos prolongados de sequía, cambiarán la forma de la penca, de leve a acentuadamente acanalada, y en caso de sequía extrema las pencas se colapsan inclinándose el extremo al suelo, con su cono central desorganizado, sin embargo la mayoría de las hojas recuperan su turgencia y forma tradicional al proporcionar agua a las plantas. La floración ocasiona en la mayoría de las especies el final de las pencas, durante la maduración de los frutos y de las semillas, proceso que generalmente toma varios meses. En algunas especies (*A. palmeri*, *A. shawii*) las hojas se vuelven amarillas, rojas o bermellón en el tiempo de floración. La longevidad de la hoja es quizá su carácter más singular. Las hojas atrapan agua como canales imbricados y dirigen el agua hacia el interior alrededor de la base del tallo (Gentry, 1982).

La forma del contorno, la longitud, el grosor, el color y la epidermis de las hojas se han observado en la descripción de las especies de agaves, pero la atención se ha dado más en las diferentes armaduras. Estas consisten de una espina terminal, casi universal en el *Agave*, y un borde cuticular lateral duro, continuo o discontinuo, algunas veces carente. Los márgenes, presentan frecuentemente salientes alternas en forma de sierra llamadas dientes. La ausencia de dientes puede ser un carácter específico, o algunas especies pueden mostrar formas en las cuales carecen de dientes. El color del diente ha sido también empleado en la caracterización de especies, pero el color en algunas especies varía según la edad de la hoja y tal vez con la temporada o con las etapas fisiológicas del crecimiento. Las zonas rojas de las pencas de *A. colorata* Gentry y el rojo carmesí de *A. palmeri* Engelm. Son propiciados por el tipo de suelo y la madurez de la planta. La longitud, color, forma, espesor y el alcance de la espina dorsal (en lo sucesivo la espina a diferencia de los dientes) ha sido también empleado para diagnósticos específicos (Gentry, 1982).

#### Indumento

En *Agave* el indumento es casi carente. Las hojas son glabras, pero la cutícula cerosa puede aparecer con un tono azulado. Una apariencia cerosa o pruinosa se desarrolla en algunas flores. Algunas especies desarrollan diminutos tubérculos epidérmicos haciéndolas escabrosas. Papilas glandulares cubren los estigmas. Aparentemente los

exudados que componen la mayor parte de la cutícula protege a la hoja de temperaturas extremas, viento, abrasión por arena y otros tipos de estrés ambiental (Gentry, 1982).

#### Inflorescencia

La inflorescencia tiene dos formas distintas; la forma espigada o racimosa del subgénero *Litsea* y la forma paniculada para el subgénero *Agave*. Las espigas más pequeñas no llegan a medir dos metros de longitud por ejemplo, *A. parviflora*, mientras que las más largas panículas alcanzan los nueve o diez metros por encima del suelo alrededor de dos a cuatro meses de crecimiento. Las hojas de la parte superior de la roseta gradúan en brácteas pedunculares y continúan en formas cada vez más pequeñas hacia arriba como las bractéolas de los pedúnculos laterales y pedicelos terminales. La secuencia foliar es comúnmente un aumento gradual seguido por un descenso, pero también puede ser un cambio abrupto en el tamaño y la forma como en *A. pumila*. Cuando se toma como un todo o en partes, las hojas pueden constituir un carácter para correlacionar especies. Generalmente los tipos de espigas y panículas de las inflorescencias son distintos. Pero hay formas en las que la espiga como en *A. lechugilla* Torr. y la panícula como en *A. potatorum* Zucc. se combinan o se unen entre las dos. La forma racimosa de la inflorescencia de *A. potatorum* aparece para ser convertida a panícula por la simple elongación de las ramas primarias o laterales. La forma espigada es más universal entre las monocotiledonias que la forma paniculada característica del subgénero *Agave*. Se infiere que la forma espigada de *Litsea* representa la forma filogenéticamente y geológicamente más antigua. Sin embargo no se puede tomar esto como regla. Todas las flores de los agaves son perfectas con un ovario ínfero, separado en tres celdas con muchos óvulos, seis iguales o desiguales tépalos en una o dos series usualmente unidos inferiormente en un tubo variable en profundidad. El perianto puede aparecer como una sola serie, pero se puede apreciar la sobreposición de los tépalos externos, como en *A. palmeri*, cuando la flor está abierta, mantenidos notoriamente sobrepuestos por tépalos mayores. La diversidad de la flora es mayor en las *Litsea*, pero el dimorfismo ha avanzado especialmente en el subgénero *Agave*. Seis filamentos filiformes, están diversamente insertados en el tubo o sobre la base del tépalo y tienen anteras longitudinalmente dehiscentes. Los tépalos externos son claramente más grandes que los internos, sus filamentos opuestos algunas veces se insertan más arriba que los filamentos alternos. Entre el ápice de las celdas del ovario y el tubo hay tejido ovárico que suele

formar un cuello estrecho o puede ser prácticamente carente de cuello. El ápice del ovario pocas veces protude (penetra) en el fondo del tubo, como en *A. striata* Zucc. y especies relacionadas (Gentry, 1982).

Las relaciones y las proporciones del tubo y los tépalos son altamente variables, cuando el género es estudiado en su totalidad. El tubo puede ser amplio y poco profundo o estrecho y profundo. Es usualmente marcado por canales someros o profundos descendiendo de los tépalos. Los tépalos pueden ser gruesos y suculentos o delgados, planares o quillados en el exterior, de varios colores, angostos o anchos, cortos o largos, doblados al interior o falcados (arqueados al exterior) en la antesis (apertura de la flor), marchitándose después de la antesis y rizándose hacia afuera y abajo (sección *Rigidae*), o permaneciendo erectos durante la antesis (*Ditepalae*) (Gentry, 1982).



Figura 1. "Del metl o maguey". Ilustración tomada del Libro Séptimo, Capítulo LXXI, p. 349 de la "Historia Natural de la Nueva España", del Protomédico Francisco Hernández, escrita entre 1571 y 1577, y publicada por la UNAM en 1959 en sus Obras Completas. t. II, v. I. En lo Ancestral hay futuro: del tequila, los mescales y otros *agaves*, 2007.

### *Metabolismo*

El metabolismo ácido crasuláceo (CAM), típico de algunos géneros y familias de plantas que crecen en zonas con altas temperaturas, constituye una especialización fisiológica en los agaves, a la cual se combina una alta radiación y baja humedad. Las plantas con metabolismo CAM tienen transpiración nocturna, abren sus estomas en la noche, fijan el carbono en ácidos orgánicos, principalmente ácido málico, que se acumulan en las vacuolas; durante el día el ácido málico es descarboxilado y se obtiene carbono, el cual es utilizado por la planta para la producción de carbohidratos. El metabolismo CAM permite obtener ganancias netas de carbono con una pérdida mínima de agua. Por lo menos diecisiete taxa de agaves tienen este tipo de metabolismo; mientras que otras son hasta cierto punto “facultativas”, ya que en condiciones de riego frecuente o en laboratorio los estomas abren de día, absorben CO<sup>2</sup> siguiendo probablemente la ruta fotosintética denominada C<sub>3</sub> (García, A. 2007).

### *Distribución y ecología*

México es considerado el origen y el centro de la biodiversidad de la familia Agavaceae con 117 de las 155 especies (75%) pertenecientes al género *Agave* nativo de éste país (García-Mendoza, 1995). En México es donde se encuentran más de 200 especies del género *Agave*, estas especies son endógenas de regiones áridas y tropicales desde el sur de E.U. hasta el norte de América del Sur y el Caribe (Lachenmeier, D. *et al.* 2006). La distribución es desde Utah en el oeste de Norte América hasta México (donde la mayoría de las especies son encontradas), así como al norte de Sudamérica y en las Islas del Caribe (Phillips, *et al.* 2000).

La mayoría de las especies de agave existen en hábitats semiáridos sobre el desierto, especialmente en los pastizales del desierto y en bosque de pino y roble. Cerca de 40 de las 150 especies de Norteamérica existen en la región del desierto de Sonora. Agaves característicamente crecen en pendientes rocosas y con buen drenaje. Diferentes especies están adaptadas para la polinización por insectos, murciélagos que comen néctar y colibríes. Las semillas son dispersadas por el viento, usualmente a solo una distancia corta del progenitor. Los dos grupos principales o subgéneros de agaves se distinguen unos de otros por el hecho de que sus inflorescencias son ramificadas o no. La mayoría de las especies en el subgénero *Agave* (inflorescencias ramificadas) desarrollan

características que les permiten ser polinizadas por murciélagos que comen néctar, aunque otros polinizadores pueden actualmente ser más importantes. Las flores son de color blanquecino hasta amarillo las cuales producen néctar copioso y polen en la noche. Los murciélagos son atraídos por la fragancia del néctar. Abejas y otros insectos diurnos ayudan en la polinización. Algunas especies son polinizadas por colibríes. Especies en el subgénero *Littaea* (que están provistas de espigas no ramificadas) son polinizadas principalmente por insectos y algunas veces por colibríes (Phillips, *et al.* 2000).

*Clasificación*

En griego, agave, agavus, significa “admirable”, y fue a partir de la especie *Agave americana* que Carlos Linneo describió el género en 1753. El género *Agave* se divide en los subgéneros: *Agave*, con inflorescencia en panícula o umbelada, y *Littaea*, en forma de espiga o racimosa (Valenzuela, 2003).

Usando las filogenias moleculares disponibles (Eguiarte *et al.*, 2000) es imposible separar a los dos subgéneros de *Agave* (*Agave* y *Littaea*) y *Manfreda* Salisb., *Polianthes* L. y *Prochnyanthes* Watson. Los cuatro géneros forman un grupo monofilético (Thiede, 2001). A este grupo se le llama “*Agave sensu lato*”, y representa más de 208 especies (Tabla 1). Se propone que por el momento se mantengan taxonómicamente los cuatro géneros de manera formal, ya que esta clasificación es más informativa que una donde se les considerara a todos como *Agave*, porque cada uno presenta características ecológicas y morfológicas diferentes, y no imposible que mejores datos moleculares apoyen esta división tradicional. Sin embargo, los cuatro géneros evolutivamente representan un grupo monofilético con muchas especies y muy variable en ecología y reproducción, y resulta fascinante su estudio con una perspectiva de ecología evolutiva (Eguiarte y Souza, 2007).

Tabla 1. Géneros y número de especies que forman la familia Agavaceae sensu Dahlgren *et al.* (1984) (Eguiarte *et al.* 2000 y Rocha *et al.* 2006)

Géneros	No. de especies total	No. de especies en México
<i>Yucca</i>	49	29
<i>Hesperoyucca</i>	1	1
<i>Hesperaloe</i>	5	5
<i>Beschorneria</i>	7	7
<i>Furcraea</i>	25	11
<i>Agave</i>	166	125
<i>Manfreda</i>	28	27
<i>Polianthes</i>	13	13
<i>Prochnyanthes</i>	1	1
Total	293	217

### *Situación actual (especies amenazadas)*

La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) es un acuerdo internacional concertado entre los gobiernos. Tiene por finalidad velar por que el comercio internacional de especímenes de animales y plantas silvestres no constituye una amenaza para su supervivencia; La especie *Agave victoria-reginae*, se encuentra listada en el Apéndice II de CITES entrada en vigor a partir del 27 de abril de 2011 (CITES, 2011). En la lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010), las especies del género *Agave* que se encuentran listadas son *A. bracteosa*, en categoría de especie amenazada; *A. chiapensis*, *A. ornithobroma*, *A. peacockii*, *A. titanota* y *A. vizcainoensis* en categoría de especies sujetas a protección especial; *A. nizandensis*, *A. victoria-reginae* en categoría de especies en peligro de extinción.

### *Usos*

El uso de las fibras de agave es extendido, se utiliza para cuerdas, redes, bolsas, cestas, tapetes, mantas, prendas de vestir, sandalias, objetos de cerámica, diversos objetos de tejido, cepillos para cabello, cepillos de pintura, instrumentos musicales y objetos ceremoniales (Gentry, 1982).

Estudios realizados sobre la exploración etnobotánica de henequén en *A. fourcroydes* indicaron que el uso del pedúnculo floral es como alimento humano y para elaborar una bebida fermentada. Se realizó un análisis bromatológico y de carbohidratos tanto del cultivado como de *A. angustifolia* indicando que su uso como alimento pudo deberse a la selección artificial ya que el silvestre presentó características agradables al gusto semejante a las del cultivado. La preferencia actual del pedúnculo pequeño como verdura se debe a su significativo contenido menor de fibra cruda y mayor de carbohidratos totales. Como bebida fermentada, se prefiere la talla grande (Colunga, *et al.* 1993).

En México, se ha aprovechado tradicionalmente este recurso natural utilizando diferentes partes de las plantas: las fibras de sus hojas permiten fabricar cuerdas (Maiti, R. 1995). Y la parte central del cuerpo rico en azúcares (Praznik, W. *et. al.* 2002), sirve para preparar miel y edulcorantes sustitutos de azúcar o para la alimentación del hombre o animales. Además, son importantes para la protección del suelo deteniendo su erosión (Granados, 1993; Maldonado-Cantú, 1996).

Las bebidas producidas con agave se pueden dividir en dos grandes grupos: las que se derivan del escurrimiento de azúcares luego del raspado del tallo –aguamiel y pulque- y aquellas que provienen del cocimiento de “cabezas”, tallos y hojas para obtener destilados como el mezcal y el tequila. La destilación fue utilizada para obtener una bebida con alto grado alcohólico después de la fermentación de los azúcares del agave cocido. El modelo tecnológico para la fabricación de alcohol de caña fue probablemente el que se siguió para producir los primeros “vinos de mezcal” en México. El concepto de mezcal-alimento, de origen indígena, cambió entonces por el de mezcal-destilado. El primer mezcal que se pudo identificar como producto de calidad fue el tequila. El agave azul fue cultivado extensivamente y cocido en hornos, lo cual le dio la certeza de disponibilidad a una industria floreciente y un sabor diferenciado de los otros mezcales. La diferencia entre los diversos mezcales y el tequila también fue el lugar de su origen, la especie de agave utilizada y el mejoramiento del proceso industrial. Los mezcales abundaron y abundan en diferentes regiones de México; ahora constituyen una industria con una normatividad y apoyo gubernamental con reconocimiento de Denominación de Origen (Valenzuela, 2003).

Muchas especies de agave son de gran importancia económica como el henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) y sisal (*Agave sisalana* Perr.), así como el tequila (*Agave tequilana* Weber), y bacanora (*Agave angustifolia* Haw.), que son la fuente de bebidas alcohólicas. Algunos como *Agave victoria reginae*, son muy apreciados como plantas ornamentales. Otros productos que se pueden obtener de agaves son los esteroides para los productos farmacéuticos y alimentos para animales, jarabes de alta fructuosa, inulina y derivados para la producción de pre-bióticos. A través de cultivo de tejidos miles de plantas pueden ser propagadas en pocos meses de una planta madre, algunos métodos descritos permiten la selección de materiales de alto rendimiento, propagación rápida de alta calidad (elite), clones seleccionados con un mínimo de variabilidad genética y la producción de poblaciones sanas para la plantación (Robert, *et al.* 2006).

Zizumbo, *et al.* (2009) Mencionan que en el occidente de la Mesoamérica prehispánica, se elaboraban alimentos y bebidas alcohólicas fermentadas de agave con una alta relevancia cultural y social. Se cree que en el occidente de México la destilación de agave se originó en colima en la época Colonial temprana a través de la adaptación de las técnicas introducidas de Filipinas.



Figura 2. Códice Florentino. Siembra de agaves. En lo Ancestral hay futuro: del tequila, los mescales y otros agaves. 2007

## 2.2. SISTEMAS DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE PLANTAS

### *Descripción general del cultivo de tejidos vegetales y la micropropagación*

El cultivo de tejidos *in vitro* comprende, en su acepción amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. Las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir así: a) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines; b) bioconversión y producción de compuestos útiles; c) incremento de la variabilidad genética; d) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas; y f) conservación e intercambio de germoplasma (Roca y Mroginski, 1993).

De estas consideraciones surge que el establecimiento de los cultivos de tejidos, es decir, la separación del explante y las operaciones relacionadas con su incubación *in vitro*,

dependará en gran medida del tipo de explante y del sistema de cultivo que se emplee, los que a su vez dependerán del objetivo perseguido (Roca y Mroginski, 1993).

#### Explante

La elección de un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; en primera instancia, dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada (Roca y Mroginski, 1993).

#### Asepsia

La asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos (bacterias, hongos), los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto básico que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su ulterior incubación y manipulación. Para establecer cultivos asépticos es conveniente o necesario: a) trabajar en ambientes adecuados; b) esterilizar los medios de cultivo; c) desinfectar superficialmente los explantes; y d) realizar los cultivos respetando ciertas normas de asepsia (Roca y Mroginski, 1993).

#### Medios de cultivo

Es necesario elegir un medio apropiado de cultivo, en el cual hay que considerar no sólo sus componentes sino su preparación (Roca y Mroginski, 1993).

#### Componentes del medio

Roca y Mroginski, (1993) señalan que en la actualidad existen innumerables formulaciones cada una de las cuales contiene entre 15 y 35 compuestos químicos que suministran:

- a) Carbono
- b) Nutrimientos minerales
- c) Vitaminas
- d) Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos)
- e) Sustancias reguladoras de crecimiento

#### f) Otros compuestos

##### Fuente de Carbono

Los tejidos vegetales cultivados *in vitro* tienen una capacidad fotosintética muy reducida o nula, por lo que se les debe proveer de una fuente de carbono orgánico. La gran mayoría de los medios utilizan sacarosa en concentraciones de 2 al 3%, además se han probado otras fuentes de carbono como la glucosa, fructosa, lactosa, galactosa, rafinosa, maltosa e incluso almidón (Pérez, *et al.* 1999).

##### Macronutrientes

Se trata de los mismos compuestos inorgánicos utilizados por las plantas en condiciones normales: Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Magnesio y Azufre (Pérez, *et al.* 1999).

##### Micronutrientes

Además de los macronutrientes anteriores, tanto las plantas normales como los tejidos cultivados *in vitro* requieren de otros compuestos inorgánicos en concentraciones generalmente mucho menores. Estos actúan como cofactores enzimáticos y algunos en sistemas de transporte de electrones. Los micronutrientes utilizados son: Manganeso, Boro, Cobre, Molibdeno, Cobalto y Yodo (Pérez, *et al.* 1999).

##### Vitaminas

Si bien los medios de cultivo contienen comúnmente varias vitaminas, es probable que en forma general sólo sea esencial la incorporación de tiamina (Roca y Mroginski, 1993).

##### Agente gelificante

En los medios semisólidos generalmente se adiciona agar (0.6 al 1.0%). Se debe considerar especialmente la pureza del agar, ya que es frecuente la presencia de impurezas de naturaleza variada; la marca comercial y las concentraciones del agar utilizado pueden alterar la respuesta *in vitro* de los cultivos (Debergh, 1982).

## Reguladores de Crecimiento Vegetal

El desarrollo de cualquier tejido vegetal es un proceso sumamente complejo en el cual interviene un gran número de factores externos e internos cuyos mecanismos precisos de acción en muchos casos aún no están claros. Entre los factores internos que controlan el desarrollo de los diferentes tejidos de una planta destacan los llamados reguladores de crecimiento vegetal (RCV), también conocidos como hormonas vegetales o fitohormonas, los RCV son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en muy pequeñas cantidades alteran el crecimiento o los patrones de desarrollo de los tejidos vegetales (Pérez, *et al.* 1999).

Los RCV se clasifican en 5 grupos básico dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Actualmente se han aislado y estudiado otras sustancias fuera de estos grupos que podrían ser también consideradas como RCV, como por ejemplo las poliaminas, jasmonatos, ácido salicílico y los brassinoesteroides (Pérez, *et al.* 1999).

El papel de la concentración de estos compuestos en un tejido, aunque importante, no es tan determinante como llegó a suponerse, pues hay otro tipo de consideraciones a tomar para explicar el proceso del desarrollo en las plantas. A pesar de lo anterior, los RCV tienen aún una gran importancia en campos como la agricultura, donde poseen un buen número de aplicaciones prácticas. Otro campo en donde se destaca el uso de los RCV es el cultivo de tejidos vegetales, ya que mediante el manejo de los tipos, concentraciones y combinaciones de estos compuestos en un medio de cultivo se pueden manipular hasta cierto grado los patrones de desarrollo de los tejidos y obtener las respuestas deseadas como la formación de tejido calloso, brotes, embriones somáticos y raíces. Por lo anterior el correcto manejo de los RCV en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales suele ser determinante para el éxito o fracaso del sistema (Pérez, *et al.* 1999).

## Otros Componentes

Existe una larga lista de componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo, como fuentes de nitrógeno reducido, factores de crecimiento, carbohidratos y otros. Entre ellos están el agua de coco, AC (5%, a 15% v/v), el jugo de frutos de tomate, el extracto de levadura y el extracto de tubérculos de papal (Roca y Mroginski, 1993).

Además de glicina, en ocasiones se incorporan al medio, otros aminoácidos como asparagina, cisteína y L-tirosina. En general, no son constituyentes esenciales de los medios e inclusive, en concentraciones relativamente altas, pueden tener efectos inhibitorios sobre los cultivos. En algunos medios se adicionan ácidos orgánicos como el cítrico, el málico, el succínico y el pirúvico; como precursores de aminoácidos, también es frecuente la adición de L-glutamina y de caseína hidrolizada (0.1% a 1.0%). El empleo de sustancias antioxidantes (ácido ascórbico, L-cisteína, polivinilpirrolidona) puede ser de utilidad para el cultivo de explantes con alto contenido de polifenoles, cuya oxidación produce oscurecimiento y eventual muerte de explantes. El carbón activado (0.1% a 5.0%), incorporado al medio, ha mostrado ser de utilidad en el cultivo de diferentes explantes, posiblemente por absorber metabolitos tóxicos (Roca y Mroginski, 1993).

La micropropagación es la técnica que ha logrado rápida aceptación en la industria y se está practicando tanto en especies hortícolas como en ornamentales y aún en leñosas. Esta metodología presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación, entre ellas se puede citar:

- a) Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo: cuando se usan métodos de propagación convencionales un esqueje produce una planta y una semilla produce una planta, sin embargo, un explante teóricamente puede producir un infinito número de plantas.
- b) Reducción del tiempo de multiplicación.
- c) Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos y en un tiempo económicamente costeable.
- d) Mayor control sanitario del material que se propaga.
- e) Facilidad de transportar el material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras.
- f) Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos.

Las plantas que vienen de un mismo meristemo, ápice, o estaca son llamadas “clones” (Abdelnour y Vicent, 1994).

Las técnicas de micropropagación permiten el acortamiento del período necesario para producir un gran número de plantas clones de años a meses. La micropropagación ha

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

sido una técnica importante tanto en la Biotecnología y en la Bioquímica y Biología Molecular de las plantas (Vázquez y Loyola, 2003).

#### *Etapas de la micropropagación*

La micropropagación presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de plántulas. Generalmente las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0) que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento (Olmos, *et al.* 2010).

#### Etapa 0: Preparación del material vegetal

La correcta elección y preparación del explante incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explante. Los factores que influyen sobre la calidad del explante son: el tipo de órgano que sirve como explante, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante (Olmos, *et al.* 2010).

La planta donante debe elegirse en base a una selección masal positiva para las características agronómicas deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de explante a establecer en condiciones *in vitro*. En general, los órganos jóvenes o bien rejuvenecidos son los que tienen mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de materiales adultos. A fin de lograr explantes de óptima calidad es conveniente hacer crecer las plantas donantes por un tiempo mínimo en condiciones de invernáculo. De esta forma es posible incidir directamente sobre el estado sanitario y la calidad de los explantes mediante el control de la intensidad lumínica, temperatura y reguladores de crecimiento (Olmos, *et al.* 2010).

#### Etapa 1: Establecimiento del cultivo

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la calidad del explante a utilizar. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes. Los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, ya sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas. La obtención de cultivos axénicos puede lograrse trabajando tanto sobre aspectos preventivos como curativos (Olmos, *et al.* 2010).

#### Etapa 2: Multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción. Las condiciones culturales en las cuales crece el explante son el resultado de la interacción de tres factores: el estado del explante o material vegetal, determinado en parte por el medio de cultivo, el recipiente de cultivo y el ambiente externo o condiciones de crecimiento del cuarto de cultivo. La capacidad de respuesta de los explantes a un mismo medio de cultivo cambia con el número de subcultivos y el tipo de explante subcultivado. La adición de algunas fitohormonas cuyo balance generalmente favorece a las citocininas, son necesarias en el proceso de organogénesis. Las citocininas más utilizadas son BA, CIN, ZEA, 2ip y TDZ. Los tipos de reguladores, sus combinaciones y rangos de concentraciones deben ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación determinada (Olmos, *et al.* 2010).

La tasa de multiplicación es muy importante en términos de eficiencia (biológica y económica), es decir, el número de propágulos, la rapidez en el crecimiento del callo, en la formación de embriones somáticos o en brotes formados a partir del explante inicial, según sea el caso (Rojas, *et al.* 2004).

#### Etapa 3: Enraizamiento

Esta etapa se da cuando se tiene los subcultivos necesarios para garantizar una cantidad determinada de plántulas *in vitro* o vitroplantas. Los explantes ya propagados se dejan crecer, formar hojas por un período según sea la especie y posteriormente son cambiados a un nuevo medio de cultivo en el cual cambiar el balance hormonal favorece a las auxinas, con el fin de inducir la formación y desarrollo de raíces. Generalmente las citocininas se reducen o desaparecen en esta etapa, hay especies en que se les

suspende todo tipo de hormonas y se da la formación de raíces. Al final de esta etapa deberá quedar formada completamente la vitroplanta (Rojas, *et al.* 2004).

#### Etapa 4: Aclimatación

Debido a que las plantas formadas en condiciones *in vitro*, crecen bajo un ambiente controlado artificialmente y en recipientes cuya humedad relativa es muy alta, se desarrollan muy débiles y con hojas que carecen de cutícula, si son llevadas a su ambiente natural pueden deshidratarse fácilmente y morir, por lo tanto es muy importante que las vitroplantas no sufran stress por falta de agua o iluminación directa del sol. Deben ser sometidas a un preacondicionamiento llamado endurecimiento (Rojas, *et al.* 2004).

Al ser sacadas del contenedor o tubo de ensayo, deben ser limpiadas de todo vestigio del medio de cultivo con agua tibia y sumergidas en una solución de un fungicida sistémico, se colocan en vasos o macetas de 250 cc en una mezcla balanceada de suelo, arena y material inerte, estéril y almacenadas en un invernadero bajo condiciones de humedad constante y baja radiación solar. Al cabo de unos siete días una vez endurecidas deben ser aclimatadas por lo que se trasplantan a un nuevo sustrato con suelo, arena y materia orgánica en condiciones de vivero (Rojas, *et al.* 2004).

#### *Tipos de Biorreactores para el cultivo de plantas*

Biorreactor es un equipo autónomo, con un ambiente estéril el cual aprovecha los nutrientes líquidos o sistemas de entrada y salida líquido/aire y está diseñado principalmente para el cultivo intensivo. La función básica de un biorreactor es proporcionar las condiciones óptimas de crecimiento mediante el control de varios factores químicos y/o físicos. Específicamente brinda la oportunidad de monitorear y tener el control de las condiciones microambientales como lo es la agitación, aireación, temperatura y pH del medio líquido (Debergh y Maene, 1984).

El uso de biorreactores con medios líquidos para la micropropagación es cada vez más popular debido a la facilidad de ampliación (Preil, 1991) y el bajo costo de producción (Paek, *et al.* 2001).

Existen varios tipos de biorreactores mecánicos o biorreactores mezcladores de aireación, los cuales han sido utilizados en el cultivo vegetal y celular para proporcionar agitación,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

circulación y aireación (Takayama, 1991; Scragg, 1992; Takayama y Akita, 1998, Ziv 2000).

En biorreactores de columna de burbujeo o airlift; la aireación, el mezclado y la circulación se proporcionan por la entrada de aire al contenedor desde un costado o desde una apertura de la base a través de un difusor (Styer, 1985; Merchuk, 1990, Cazzulino *et al.*, 1991; Preil, 1991). Los biorreactores de inmersión temporal o flujo y reflujo han sido descritos como sistemas de mejor aireación, esto a través de la inmersión periódica y la exposición a la fase gaseosa (Etienne *et al.*, 1997).

Green y Thomas (1996), desarrollaron un sistema de biorreacción que incluía un biorreactor integral y un separador. El volumen de medio que se manejó fue de 8 litros, empleados para el cultivo de explantes de *Nicotiana glauca*, *Nicotiana rustica* y *Datura stramonium*. Las raíces de *N. glauca* se obtuvieron por transformación con la cepa LBA9402 de *Agrobacterium rhizogenes*. Este trabajo permitió establecer que la demanda de oxígeno de las raíces transformadas allí empleadas era baja (demanda máxima de la *Nicotiana glauca* 0.07 mmol de O<sub>2</sub>/h/g peso fresco).

Chatterjee, *et al.* (1997). Llevaron a cabo el cultivo de raíces pilosas en biorreactores de niebla, en los cuales se encontró un aumento significativo en la biomasa de las raíces.

Luczkiewicz y Kokotkiewicz (2005). Propusieron el uso de un biorreactor de burbujeo y canasta para el cultivo de raíces de *G. tinctoria*, donde se empleó como inóculo 5 g de peso fresco de vástagos y fragmentos de raíces por cada 100 ml de medio, en recipientes de 250 ml. El medio empleado era S&H suplementado con 3% de sacarosa y 24.6 mmol/l de IBA.

*Sistemas de inmersión temporal y algunos ejemplos de su eficiencia con diversas especies de plantas*

Alvard, *et al.* (1993). Investigaron cinco diferentes métodos en medio de cultivo líquido para la propagación de meristemas de bananas, los cuales se compararon con el medio de cultivo sólido; donde los tratamientos estudiados fueron: medio de cultivo gelificado, medio líquido con inmersión de las plantas, medio líquido con soporte de cultivo de celulosa, medio líquido con inmersión parcial de plantas, medio líquido aireado por burbujeo y medio líquido con inmersión temporal de explantes, de los cuales la mayor

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tasa de multiplicación fue observada en los explantes sometidos a la inmersión temporal en el medio.

Escalona, *et al.* (2003). Evaluaron los efectos de las condiciones sobre el cambio fisiológico en plántulas de piña (*Ananas comosus* L. (Merr) cv. Smooth cayenne), se manejaron agrupaciones axilares en dos métodos de cultivo los cuales fueron micropropagación convencional en medio líquido y biorreactor de inmersión temporal. Señalaron que los Biorreactores de inmersión temporal utilizados aumentaron la actividad respiratoria de los brotes y una extraordinaria absorción de nutrientes, indicando un alto metabolismo fotomixotrópico. Por esta razón, un buen entendimiento del cultivo en inmersión temporal y de la fisiología de la planta en el momento de transferir a condiciones *ex vitro* pueden servir de guía para saber cómo optimizar el procedimiento de aclimatación con el fin de reducir pérdidas de plantas.

Bethouly y Etienne (2005), señalan que los sistemas de cultivo en medio líquido tienen ventajas, por ejemplo las condiciones de cultivo son mucho más uniformes, el medio puede ser cambiado fácilmente. Optimizar el volumen del medio de cultivo y el volumen del recipiente mejora de forma substancial la eficiencia, especialmente para la proliferación de brotes. El uso de medio líquido para el cultivo *in vitro* ha sido objeto de numerosos estudios durante muchos años. También ha sido frecuentemente considerada una técnica ideal para la producción masiva ya que reduce la mano de obra y facilita el cambio en la composición del medio.

Ziv (2005), menciona que los Biorreactores proporcionan un rápido y eficiente sistema de propagación vegetal para muchas especies agrícolas y forestales, utilizando medios líquidos para evitar la manipulación manual intensiva. El cultivo en Biorreactores tiene varias ventajas en comparación con los cultivos basados en agar con un mejor control en el contacto del tejido de la planta con el medio de cultivo, los nutrientes óptimos y la oferta reguladora de crecimiento, así como la aireación y la circulación del medio, la filtración del medio y el escalamiento de los cultivos.

Los Biorreactores de inmersión temporal proporcionan una excelente manera de utilización de medio líquido al mismo tiempo que controla el ambiente gaseoso. Por otra parte puede proporcionar la posible automatización del sistema de producción lo que facilita el bajo costo de producción (Afreeen, 2006).

Las técnicas de cultivo en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT) constituyen una herramienta eficaz para la propagación de plántulas, pues aumenta el coeficiente de multiplicación y la calidad de estas. Poco se conoce hasta el momento sobre la ecofisiología de esta novedosa técnica de cultivo, donde las plántulas son sometidas a una inmersión en medio líquido y los cambios fisiológicos que se producen durante esta etapa serán los responsables de la calidad de las plántulas (Aragón, *et al.* 2006).

Akula *et al.* (2000), reportaron que la frecuencia y el tiempo de inmersión generó un impacto sobre las tasas de multiplicación en té. El sistema RITA® ha sido utilizado para aumentar el desarrollo de raíces en *Hevea brasiliensis* (Etienne, *et al.* 1997). Otras ventajas que se han encontrado en otros estudios realizados son: un mejor desarrollo foliar, disminución de la hiperhidricidad y reducción de la asfixia de los tejidos (Aitken-Christie *et al.*, 1995).

Alister *et al.* (2005), utilizando RITA® para el cultivo de *Eucalyptus*, señalan que los costos por 10,000 plantas son menores a los del sistema semisólido. El sistema RITA® por lo tanto tiene un gran potencial para la producción *in vitro* de plantas comerciales de *Eucalyptus*.

Se llevó a cabo la aplicación de un Sistema de Inmersión Temporal para fresa (*Fragaria X ananassa*) donde se regeneraron brotes adventicios a partir de explantes de hoja, esto fue estudiado utilizando un Sistema de Inmersión Temporal comercialmente disponible, el biorreactor RITA®, esto fue hecho como el primer paso en un proceso para explorar las posibilidades del uso a futuro de los Sistemas de Inmersión Temporal para transformación de fresa en donde utilizando los sistemas convencionales por lo general se produce con baja eficiencia (Hanhineva, *et al.* 2005).

Los Biorreactores de Inmersión Temporal (TIS) han sido descritos para la multiplicación *in vitro* de una amplia gama de cultivos tropicales. Protocolos de laboratorio están disponibles para la multiplicación de brotes, embriones somáticos y producción de microtubérculos. Siete especies son ahora propagadas comercialmente por ésta técnica de cultivo (*Ananas comosus*, *Coffea arabica*, *Cymbopogon citratus*, *Musa* sp., *Phalaenopsis*, *Saccharum* sp., *Solanum tuberosum*) con diferentes vías de regeneración y una variedad de diseños de TIS. Junto al desarrollo de métodos para la producción de embriones somáticos en TIS, la multiplicación por brotes es la más aplicada desde el

punto de vista comercial. El biorreactor RITA® demostró ser una herramienta adecuada a escala en laboratorio y para la investigación (Jiménez, 2005).

### **2.3. ANTECEDENTES SOBRE LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE AGAVES**

Los agaves son uno de los grupos vegetales más representativos de México. Su importancia va desde su valor ecológico y económico, hasta su aspecto cultural. Desafortunadamente, muchas especies de este grupo han sido descuidadas desde los puntos de vista del mejoramiento, explotación racional y conservación. En este sentido, la Biotecnología Vegetal puede aportar herramientas valiosas que permitan el mejor aprovechamiento de estas plantas y aseguren al mismo tiempo su conservación. La regeneración *in vitro* se ha alcanzado a través de la obtención de brotes a partir de meristemas axilares localizados en el segmento basal de las plantas, o bien a través de organogénesis o embriogénesis somática indirecta (Domínguez, *et al.* 2008a).

Una serie de reportes han aparecido en la propagación *in vitro* de las especies de *Agave* donde se han utilizado segmentos de tallo, rizoma y callo inducido (Robert, *et al.* 1987), explantes de bulbillos y callo inducido (Powers y Backhouse 1989) así como fragmentos de semillas y callo inducido (Frydrych, 1982). Gran parte del cultivo de tejidos en Agavaceae, ha sido llevado a cabo en especies ornamentales (Madrigal, *et al.* 1989). A través de propagación mediante embriogénesis somática se han obtenido la regeneración de especies como *A. victoria-reginae*, *A. sisalana*, *A. tequilana* y *A. vera-cruz* (Martínez, *et al.* 2003; Nikam, *et al.* 2003; Portillo, *et al.* 2007; Tejavathi, *et al.* 2007).

Durante los últimos años el cultivo de tejidos vegetales ha surgido como una poderosa herramienta para la propagación efectiva de agaves, la organogénesis directa e indirecta han sido reportadas para varias especies como *A. arizonica* (Powers y Backhaus, 1989), *A. atrovirens* y *A. fourcroydes* (Madrigal, *et al.* 1989; Robert *et al.* 1987), *A. cantala* (Binh, *et al.* 1990), *A. sisalana* (Binh, *et al.* 1990; Hazra, *et al.* 2002), *Agave sp.* (Groenewald, *et al.* 1977) y *A. tequilana* (Castro, *et al.* 1990; Rodríguez, *et al.* 1996; Valenzuela, *et al.* 2006).

Se ha llevado a cabo la propagación de brotes axilares de *Agave parrasana* (Santacruz, *et al.* 1999). Regeneración de brotes de *A. sisalana* a partir de meristemas basales (Das 1992; Nikam 1997). Producción de sapogeninas así como el cultivo de tejido calloso de *A. amaniensis* (Andrijany, *et al.* 1999). Generación de brotes a través de organogénesis

directa a partir de segmentos de médula de tallo de *A. angustifolia* (Enríquez del Valle, *et al.* 2005). Generación de brotes a partir de meristemos de *A. salmiana* (Silos, *et al.* 2007).

Domínguez, *et al.* (2008b). Describieron el desarrollo de protocolos para la propagación *in vitro* de diferentes especies de *Agave*, las cuales fueron *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum*; donde se utilizaron tejidos meristemáticos como explantes para la formación de brotes en diferentes concentraciones de citocininas. Las citocininas que se utilizaron fueron 6-Bencilaminopurina (BA), 6- $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilaminopurina (2iP) cinetina (Cin), tidiazurón (TDZ) y meta-topolina o N<sup>6</sup> (metahidroxibencil)adenina (MT).

Ramírez *et al.* (2008). Establecieron protocolos confiables de propagación *in vitro* para algunas especies de *Agave* las cuales fueron *A. salmiana* subespecie *crassispina*, *A. duranguensis*, *A. oscura*, *A. pigmaea* y *A. victoria-reginae*, con el fin de obtener un sistema eficaz para la micropropagación. Se utilizaron reguladores de crecimiento vegetal como IBA (Ácido indol-3-butírico), BA (N<sup>6</sup>-benciladenina) y 2,4-D (Ácido diclorofenoxiacético) en diferentes concentraciones.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los Agaves representan para México un recurso de importancia ecológica, económica, cultural, social y agrícola. Las técnicas biotecnológicas convencionales para la propagación masiva de algunas especies del género *Agave* ya se han desarrollado y resultan más eficientes que cualquiera de los métodos de propagación convencional. Se han usado medios de cultivos semisólidos y recipientes convencionales de tamaño reducido. Estos sistemas requieren de mucho trabajo especializado y de amplias áreas de incubación. Además, los agentes gelificantes representan una proporción muy significativa del costo de los medios de cultivo. De ahí la importancia de desarrollar sistemas alternativos que, manteniendo o incrementando la productividad, permitan reducir los costos de producción y simplificar el trabajo. Los biorreactores de inmersión temporal son una alternativa a la propagación *in vitro* convencional, estos se han utilizado para la propagación masiva de diferentes especies vegetales, demostrando ser altamente eficientes. Los sistemas de inmersión temporal pueden ser un método potencialmente útil para obtener un incremento en la producción de agaves, así como una reducción en los costos y en el tiempo de trabajo que se requiere para la producción masiva de plantas de *Agave*. Este trabajo pretende llevar a cabo la propagación masiva *in vitro* de varias especies de *Agave* a través de sistemas convencionales, y en sistemas de inmersión temporal, con el fin de comparar la eficiencia de ambos métodos. Esto se hará con varias especies mexicanas del género *Agave*. También se propone el diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal alternativo a los comerciales debido al alto costo de éstos.

### **4. HIPÓTESIS**

Es posible propagar *in vitro* de forma masiva y eficiente diversas especies de *Agave*. Esto puede hacerse tanto por la vía tradicional en medios semisólidos y recipientes de cultivo de baja capacidad, como en sistemas de inmersión temporal. Se plantea la hipótesis de que estos últimos serán más eficientes en términos de tiempo, productividad y costo.

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo General

Propagar *in vitro* varias especies mexicanas del género *Agave*, esto a través de métodos convencionales y sistemas de inmersión temporal, esto con el fin de comparar la eficiencia de ambas metodologías.

### Objetivos Específicos

- Propagar *in vitro*, a través de métodos convencionales en medio semisólido, las especies *Agave bracteosa*, *A. celsii*, *A. chiapensis*, *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. funkiana*, *A. karwinskii*, *A. nizandensis*, *A. obscura*, *A. ornithobroma*, *A. palmeri*, *A. peacockii*, *A. potatorum*, *A. salmiana*, *A. titanota*, *A. victoria-reginae*, *A. vizcainoensis*.
- Seleccionar, de entre las anteriores, tres especies que hayan mostrado respuestas contrastantes en los sistemas de propagación *in vitro* convencionales, y propagarlas bajo un sistema comercial de inmersión temporal.
- Construir un Sistema alternativo de inmersión temporal, usando materiales de bajo costo disponibles a nivel local, y probar su eficiencia con las tres especies seleccionadas.
- Hacer un análisis de la eficiencia de los sistemas probados en cuanto a número de plantas que se generan, calidad de las plantas, tiempo y costo.

## 6. METODOLOGÍA

De acuerdo a los objetivos específicos, se indica de la siguiente manera:

### 6.1. PROPAGACIÓN *IN VITRO* MEDIANTE MÉTODO CONVENCIONAL

#### 1.1. Material vegetal

Se emplearon como explantes meristemas basales de las especies *Agave bracteosa*, *A. celsii*, *A. chiapensis*, *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. funkiana*, *A. karwinskii*, *A. nizandensis*, *A. obscura*, *A. ornithobroma*, *A. palmeri*, *A. peacockii*, *A. potatorum*, *A. salmiana*, *A. titanota*, *A. victoria-reginae*, *A. vizcainoensis*. Los explantes se obtuvieron a partir de plántulas propagadas *in vitro* procedentes del banco de germoplasma del laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

#### 1.2. Preparación de Medio de Cultivo MS

El medio de cultivo basal que se utilizó fue la formulación conocida como MS (Murashige & Skoog) suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y como agente gelificante se utilizó agar a diferentes concentraciones (9 o 10 g L<sup>-1</sup> dependiendo de la especie). A este medio se le adicionaron los reguladores de crecimiento vegetal empleados para las diferentes especies. Las citocininas que se utilizaron fueron 6-Bencilaminopurina (BA), 6-γ, γ-dimetilalilaminopurina (2iP) cinetina (CIN), tiazurón (TDZ) y meta-topolina o N<sup>6</sup> (metahidroxibencil)adenina (mT) (Tabla 2). El tipo y concentración de citocinina, así como la concentración del gelificante adicionado al medio de cultivo para cada especie, habían sido definidos en el marco de trabajos previos en el laboratorio de Biotecnología Vegetal (Domínguez, et al. 2008a y 2008b).

Tabla 2. Especies de *Agave*, concentración de agar utilizada para cada especie, tipo de reguladores de crecimiento vegetal y su concentración. Las citocininas que se utilizaron fueron 6-Bencilaminopurina (BA), 6- $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilaminopurina (2iP) cinetina (CIN), tidiazurón (TDZ) y meta-topolina o N<sup>6</sup> (metahidroxibencil)adenina (mT).

Especie	Regulador de crecimiento vegetal	Concentración evaluada (mg L <sup>-1</sup> )	Concentración de Agar (g L <sup>-1</sup> )
<i>Agave bracteosa</i>	BA	1.0	10
<i>Agave celsii</i>	mT	0.5	9
<i>Agave chiapensis</i>	BA	0.5	9
<i>Agave cupreata</i>	BA	1.5	10
<i>Agave difformis</i>	TDZ	0.2	10
<i>Agave funkiana</i>	BA	1.5	9
<i>Agave karwinskii</i>	BA	1.5	10
<i>Agave nizandensis</i>	BA	1.0	9
<i>Agave obscura</i>	TDZ	0.2	10
<i>Agave ornithobroma</i>	BA	0.5	10
<i>Agave palmeri</i>	TDZ	0.5	10
<i>Agave peacockii</i>	BA	0.5	9
<i>Agave potatorum</i>	CIN	3.0	10
<i>Agave salmiana</i>	TDZ	0.1	10
<i>Agave titanota</i>	BA	1.0	9
<i>Agave victoria-reginae</i>	2iP	5.0	10
<i>Agave vizcainoensis</i>	BA	2.0	9

### 1.3. Proliferación de los brotes en medio de cultivo *in vitro* convencional

Para la obtención de los explantes se tomaron las plántulas y se eliminó la parte apical de todas las hojas. También se eliminaron las raíces, obteniéndose así un explante basal por cada plántula. De cada especie de *Agave* se inocularon tres explantes por recipiente de cultivo, manteniendo su polaridad (la parte que quedaba hacia arriba en la planta quedó hacia arriba en el medio); se tuvo un total de 15 explantes por especie. Se

incubaron los frascos a 25°C en condiciones de luz/oscuridad 12/12 h. Posteriormente se revisaron frecuentemente y la brotación fue registrada a los 45 días. Se llevó a cabo tres repeticiones en total para cada especie.

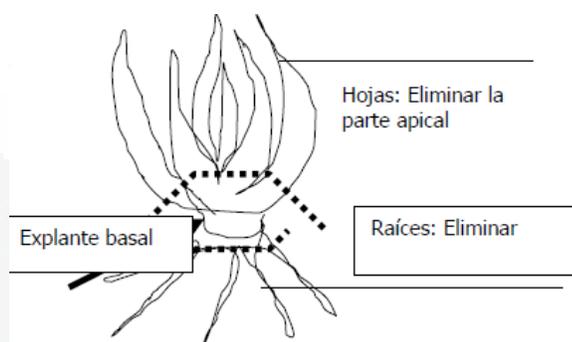


Figura 3. Dirección de los cortes para obtener los segmentos basales de *Agave*. Las líneas punteadas indican la dirección de cada corte hecho para obtener los explantes deseados.

## 6.2. PROPAGACIÓN DE TRES ESPECIES DE AGAVE EN SISTEMA COMERCIAL DE INMERSIÓN TEMPORAL

Las tres especies de *Agave* seleccionadas fueron *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis*, la selección se hizo de acuerdo a la cantidad de brotes que se obtuvieron, así como a la calidad de las plantas.

### 2.1. Material vegetal

Se emplearon como explantes meristemas basales de las especies *A. difformis*, *A. potatorum* y *A. salmiana*.

### 2.2. Proliferación de los brotes en Sistema de Inmersión Temporal (RITA®)

RITA® es una marca registrada de Vitropic S.A. Z373206 SIGMA

Se preparó 200 mL de medio MS de la misma manera como se señala anteriormente sin Agar como gelificante y con reguladores de crecimiento vegetal Cinetina (CIN) y Tidiazuron (TDZ) de acuerdo a la especie. Se seleccionaron las especies *A. potatorum*,

*A. salmiana* y *A. difformis* para llevar a cabo la proliferación de brotes en sistema RITA®. Para la obtención de explantes se tomaron las plántulas y se eliminó la parte apical de todas las hojas. También se eliminaron las raíces, obteniéndose así un explante basal por cada plántula. Se realizó la misma técnica empleada con el cultivo *in vitro* convencional. De cada especie de *Agave* se inocularon cinco explantes por biorreactor, cada biorreactor se utilizó para una especie diferente. Se sometieron los biorreactores a 25°C en condiciones de luz/oscuridad 12/12 h. Posteriormente se revisaron frecuentemente y la brotación fue registrada a los 50 días.

Los tiempos y frecuencias de inmersión establecidos fueron los siguientes; para el primer experimento se llevó a cabo un tiempo de inmersión de 5 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 12 horas, en el segundo experimento el tiempo y frecuencia de inmersión fue de 10 minutos cada 6 horas, posteriormente un tercer experimento consistió en 15 minutos de inmersión cada 3 horas y finalmente el cuarto experimento fue de 20 minutos de inmersión cada 8 horas.

Los experimentos que se llevaron a cabo con el sistema de inmersión temporal comercial fueron utilizados para las tres especies de *Agave* señaladas. Se evaluó el número de brotes generados por explante, porcentaje de brotación y calidad de los brotes. Se realizó un Análisis de varianza (ANOVA) con una  $P < 0.05$  para obtener el promedio de brotes por explante para cada especie. Se hizo una prueba de Tukey de comparaciones múltiples con una  $P < 0.05$ . (Figuras 13-16).

### **6.3. PROPAGACIÓN DE TRES ESPECIES DE AGAVE EN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL ALTERNO**

Se seleccionaron las especies *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis* para ser propagadas en Sistemas de inmersión temporal alterno El tiempo de inmersión utilizado fue de 5 minutos con una frecuencia de inmersión de 12 horas. El volumen del medio líquido utilizado fue de 200 mL, se utilizó como medio de cultivo MS (Murashige & Skoog 1962) suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. A este medio se le adicionaron los reguladores de crecimiento vegetal, para *A. potatorum* fue de 3.0 mgL<sup>-1</sup> CIN, *A. salmiana* 0.1 mgL<sup>-1</sup> TDZ y *A. difformis* 0.2 mgL<sup>-1</sup> TDZ.

### 3.1. Material vegetal

Se emplearon como explantes meristemos basales de las especies *A. difformis*, *A. potatorum* y *A. salmiana*

### 3.2. Preparación de medio de Cultivo MS

Se preparó 200 mL de medio MS de la misma manera como se señala anteriormente sin Agar como gelificante y con reguladores de crecimiento vegetal Cinetina (CIN) y Tidiázuron (TDZ) de acuerdo a la especie.

Todo el material fue esterilizado en autoclave a 120°C durante 20 minutos, excepto los filtros.

En la campana de flujo laminar se llevó a cabo la obtención de los explantes de la misma manera como se señala en los apartados anteriores. Se utilizaron cinco explantes por especie.

### 3.3. Construcción del Sistema de Inmersión Temporal alterno y montaje del Sistema

Debido al costo de los sistemas de inmersión temporal RITA<sup>®</sup>, se optó por la construcción de un sistema de inmersión temporal alterno, el cual consistía en utilizar dos frascos donde uno contenía el medio de cultivo MS líquido con reguladores de crecimiento vegetal (dependiendo para cada especie) y el otro frasco contenía a los explantes.

Se llevó a cabo la construcción del Sistema de inmersión temporal alterno de la siguiente manera:

Este sistema se construyó con materiales que pueden ser encontrados en el mercado nacional.

Para la construcción del sistema de inmersión temporal se requirió de seis frascos de vidrio marca KIMAX<sup>®</sup> y SCHOTT DURAN<sup>®</sup> de 500 mL, dos temporizadores digitales de ocho eventos marca STEREN<sup>®</sup>, seis bombas de aire OceanAqua<sup>®</sup> y ELITE 799<sup>®</sup>, manguera para bomba de aire de acuario de 0.5 mm resistente a alta temperatura, seis filtros Millex<sup>®</sup>, como válvulas se utilizaron seis llaves de tres vías con tubo KORTX<sup>®</sup>

Las tapaderas de los frascos fueron perforadas y selladas con tapones a los cuales se les realizaron tres perforaciones y fueron colocadas en dos de las perforaciones tubos de metal de 0.3 mm de diámetro y el tercer orificio fue cubierto por tubo de metal cerrado o de vidrio, a cada frasco se le colocó una manguera insertada en uno de los tubos y por adentro del frasco.

Para cada Sistema se realizó la siguiente metodología:

Se utilizaron dos frascos, dos bombas de aire, dos filtros, dos llaves de tres vías, 7 fragmentos de manguera para bomba de aire de acuario de 0.5 mm de diámetro de las siguientes medidas:

Manguera adentro del frasco	18.5 cm
Manguera que une a los dos frascos	15.5 cm
Manguera que soporta al filtro	3 cm
Manguera unida a la bomba	3 cm

A uno de los frascos se le vertió el medio MS líquido y al otro frasco se le colocaron los cinco explantes.

Se colocó una manguera en uno de los tubos, (el cual contenía la otra manguera por adentro del frasco) y se unió en otro de los tubos de otro frasco (el cual también contenía otra manguera por adentro), se colocó otra manguera corta por afuera del frasco en el segundo tubo y se le colocó el filtro, de igual manera se hizo en el otro frasco.

Se colocó la llave de tres vías en el filtro y se le unió un fragmento de manguera corto para posteriormente unir el sistema a una bomba de aire, lo mismo se realizó con el otro frasco.

Las bombas fueron colocadas en una serie de conexión la cual estaba conectada a un temporizador, de igual manera se realizó con la otra bomba del siguiente frasco pero conectada a otra serie y a otro temporizador.

Este procedimiento se realizó para los tres sistemas. La programación del sistema fue de cada 24 horas de frecuencia de inmersión con 5 minutos de tiempo de inmersión.

#### 6.4. ANÁLISIS DE LA EFICIENCIA DE LOS SISTEMAS PROBADOS EN CUANTO A NÚMERO DE PLANTAS QUE SE GENERAN, CALIDAD DE LAS PLANTAS, TIEMPO Y COSTO.

Se hizo un análisis de costo de productos y reactivos utilizados para los sistemas de inmersión temporal así como también para el sistema de cultivo con medio semisólido. El número de plantas y calidad de las plantas que se generaron, viene explicado en el apartado de resultados. En el sistema de cultivo *in vitro* convencional el tiempo que se utilizó para el registro de los brotes obtenidos fue de 45 días posteriores al subcultivo de los explantes, para el caso de los demás sistemas utilizados el tiempo fue de 50 días.



Figura 4. Construcción de un Sistema Alternativo de Inmersión Temporal. A) Se seleccionaron explantes de meristemos basales de *A. salmiana*. B) Se colocaron los explantes en un frasco para reactivo marca KIMAX®, mientras en otro frasco se colocó 200 mL de medio MS líquido adicionado con  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ. C) Se colocó manguera para unir a los dos frascos, se colocaron otras mangueras en cada uno de los tubos de los frascos y se colocaron filtros Millex® en cada una de estas mangueras. D) Se colocó sobre cada filtro una llave de tres vías con tubo KORTEX®. E) Se unió bombas para pecera a cada una de las llaves mediante un fragmento de manguera. F) Sistema unido a temporizador para las especies *A. potatozum*, *A. salmiana* y *A. difformis*

## 6.5. PROPAGAR UNA ESPECIE DE AGAVE EN INMERSIÓN COMPLETA

Se sometieron explantes de meristemas basales de *A. potatorum* a inmersión completa en medio de cultivo MS y regulador de crecimiento vegetal. La inmersión completa consistió en sumergir los explantes durante un tiempo de 50 días aproximadamente en el medio de cultivo líquido; esto con la finalidad de observar si había obtención de brotes y la calidad de los brotes obtenidos al mantener los explantes sumergidos por tiempo completo.

### 5.1. Material vegetal

Se emplearon como explantes meristemas basales de la especie *A. potatorum*

### 5.2. Preparación de Medio de Cultivo MS

La preparación del medio fue igual que en el primer objetivo específico, exceptuando la utilización de Agar como gelificante. Se utilizaron 200 mL de medio MS y Cinetina como regulador de crecimiento vegetal.

### 5.3. Material

Se utilizó frasco para reactivo marca KIMAX® de 500 MI

### 5.4. Proliferación de los brotes en Sistema de Inmersión Completa

Para la obtención de explantes se tomaron las plántulas y se eliminó la parte apical de todas las hojas. También se eliminaron las raíces, obteniéndose así un explante basal por cada plántula. Se realizó la misma técnica empleada con el *cultivo in vitro* convencional. Se inocularon cinco explantes por frasco, se sometió a condiciones de temperatura de 25°C en condiciones de luz/oscuridad 12/12 h. Posteriormente se revisaron frecuentemente y la brotación fue registrada a los 50 días.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. MULTIPLICACIÓN DE BROTES EN MEDIO DE CULTIVO *IN VITRO* CONVENCIONAL**

De cada especie de *Agave* se inocularon tres explantes por recipiente de cultivo, se tuvo un total de 15 explantes por especie.

En este experimento se analizó el número de brotes por explante, porcentaje de brotación y calidad de los brotes. La brotación fue favorable para todas las especies. La calidad para la mayoría de las especies fue buena, siendo que para algunas especies se presentó tejido calloso.

Se realizó un Análisis de varianza (ANOVA) con una  $P < 0.05$  para obtener el promedio de brotes por explante en las tres repeticiones que se llevaron a cabo para cada especie. Se hizo una prueba de Tukey de comparaciones múltiples con una  $P < 0.05$ . (Figuras 5-9). Esto con la finalidad de conocer el grado de variabilidad en cuanto al número de brotes producidos por explante en tres experimentos independientes. En las especies *A. celsii*, *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. funkiana*, *A. karwinskii*, *A. nizandensis*, *A. obscura*, *A. ornithobroma*, *A. palmeri*, *A. peacockii*, *A. potatorum*, *A. salmiana*, *A. titanota*, *A. victoria-reginae*, *A. vizcainoensis* el ANOVA no arrojó diferencias significativas entre las repeticiones, por lo que se asume que el proceso de generación de brotes es reproducible. Por el contrario, en las especies *A. bracteosa* y *A. chiapensis*, el ANOVA fue significativo, lo que se indica que el proceso de generación de brotes no es reproducible, sino que puede variar de un experimento a otro. El programa estadístico utilizado fue GraphPad PRISM versión 5.00.

Tabla 3. Resultados del experimento de micropropagación de *Agave* mediante cultivo *in vitro* convencional. Se indica el tratamiento utilizado, número de subcultivos realizados, porcentaje de brotación por cada subcultivo y número de brotes por explante por cada subcultivo. Las citocininas que se utilizaron fueron 6-Bencilaminopurina (BA), 6-γ, γ-dimetilalilaminopurina (2iP) cinetina (CIN), tidiazurón (TDZ) y meta-topolina o N<sup>6</sup> (metahidroxibencil)adenina (mT). n= 15

Especie	Tratamiento	Número subcultivo	Brotación (%)	Brotes/Explante (media±ES)
<i>Agave bracteosa</i>	1.0 BA	1	86.67	10.5±1.39
		2	100	5.80±0.88
		3	100	7.13±1.05
<i>Agave celsii</i>	0.5 mT	1	80	7.07±1.30
		2	93.33	9.60±1.52
		3	73.33	9.60±1.59
<i>Agave chiapensis</i>	0.5 mT	1	100	9.47±0.77
		2	93.33	5.33±0.91
		3	93.33	5.20±0.90
<i>Agave cupreata</i>	1.5 BA	1	100	12.7±0.99
		2	100	9.67±1.06
		3	93.33	10.7±1.46
<i>Agave difformis</i>	0.2TDZ	1	80	2.73±0.51
		2	100	3.53±0.36
		3	86.67	2.27±0.30
<i>Agave funkiana</i>	1.5 BA	1	86.67	11.1±1.46
		2	100	11.2±0.70
		3	86.67	9.93±1.31
<i>Agave karwinskii</i>	1.5 BA	1	93.33	3.67±0.48
		2	80	2.33±0.49
		3	93.33	2.53±0.34
<i>Agave nizandensis</i>	1.0 BA	1	80	7.07±1.27
		2	100	8.33±0.70
		3	100	8.40±1.01
<i>Agave obscura</i>	0.2 TDZ	1	60	8.20±1.86
		2	86.67	9.60±1.14
		3	80	8.27±1.55
<i>Agave ornithobroma</i>	0.5 BA	1	80	9.33±1.50
		2	100	12.4±0.98
		3	100	11.5±0.91
<i>Agave palmeri</i>	0.5 TDZ	1	60	1.07±0.28
		2	60	1.60±0.48
		3	60	1.20±0.31
<i>Agave peacockii</i>	0.5 BA	1	100	14.9±1.40
		2	100	12.1±0.91
		3	100	13.1±0.87
<i>Agave potatorum</i>	3.0 CIN	1	100	4.40±0.79
		2	93.33	4.27±0.77
		3	93.33	5.93±0.64
<i>Agave salmiana</i>	0.1 TDZ	1	93.33	10.5±1.12
		2	86.67	9.00±1.28
		3	100	9.87±1.34
<i>Agave titanota</i>	1.0 BA	1	100	13.2±0.96
		2	100	10.9±1.06
		3	86.67	9.20±1.51
<i>Agave victoria-reginae</i>	5.0 2iP	1	86.67	9.07±1.24
		2	86.67	11.0±1.42
		3	86.67	10.7±1.34
<i>Agave vizcainoensis</i>	2.0 BA	1	100	2.87±0.44
		2	86.67	2.93±0.47
		3	80	1.73±0.35

Tabla 4. Brotes por explante obtenidos de las tres repeticiones realizadas para cada especie de *Agave*. Las citocininas que se utilizaron fueron 6-Bencilaminopurina (BA), 6- $\gamma$ ,  $\gamma$ -dimetilalilaminopurina (2iP) cinetina (CIN), tidiazurón (TDZ) y meta-topolina o N<sup>6</sup> (metahidroxibencil)adenina (mT). n=45

Especie de <i>Agave</i>	Tipo de tratamiento	Brotes por explante (media $\pm$ error estándar)
<i>Agave bracteosa</i>	1.0 BA	7.82 $\pm$ 0.70
<i>Agave celsii</i>	0.5 mT	8.76 $\pm$ 0.85
<i>Agave chiapensis</i>	0.5 BA	6.67 $\pm$ 0.57
<i>Agave cupreata</i>	1.5 BA	11.02 $\pm$ 0.69
<i>Agave difformis</i>	0.2 TDZ	2.84 $\pm$ 0.24
<i>Agave funkiana</i>	1.5 BA	10.74 $\pm$ 0.68
<i>Agave karwinskii</i>	1.5 BA	2.84 $\pm$ 0.26
<i>Agave nizandensis</i>	1.0 BA	7.93 $\pm$ 0.58
<i>Agave obscura</i>	0.2 TDZ	8.69 $\pm$ 0.87
<i>Agave ornithobroma</i>	0.5 BA	11.1 $\pm$ 0.68
<i>Agave palmeri</i>	0.5 TDZ	1.29 $\pm$ 0.21
<i>Agave peacockii</i>	0.5 BA	13.4 $\pm$ 0.63
<i>Agave potatorum</i>	3.0 CIN	4.87 $\pm$ 0.42
<i>Agave salmiana</i>	0.1 TDZ	9.80 $\pm$ 0.71
<i>Agave titanota</i>	1.0 BA	11.1 $\pm$ 0.72
<i>Agave victoria-reginae</i>	5.0 2iP	10.26 $\pm$ 0.76
<i>Agave vizcainoensis</i>	2.0 BA	2.51 $\pm$ 0.25

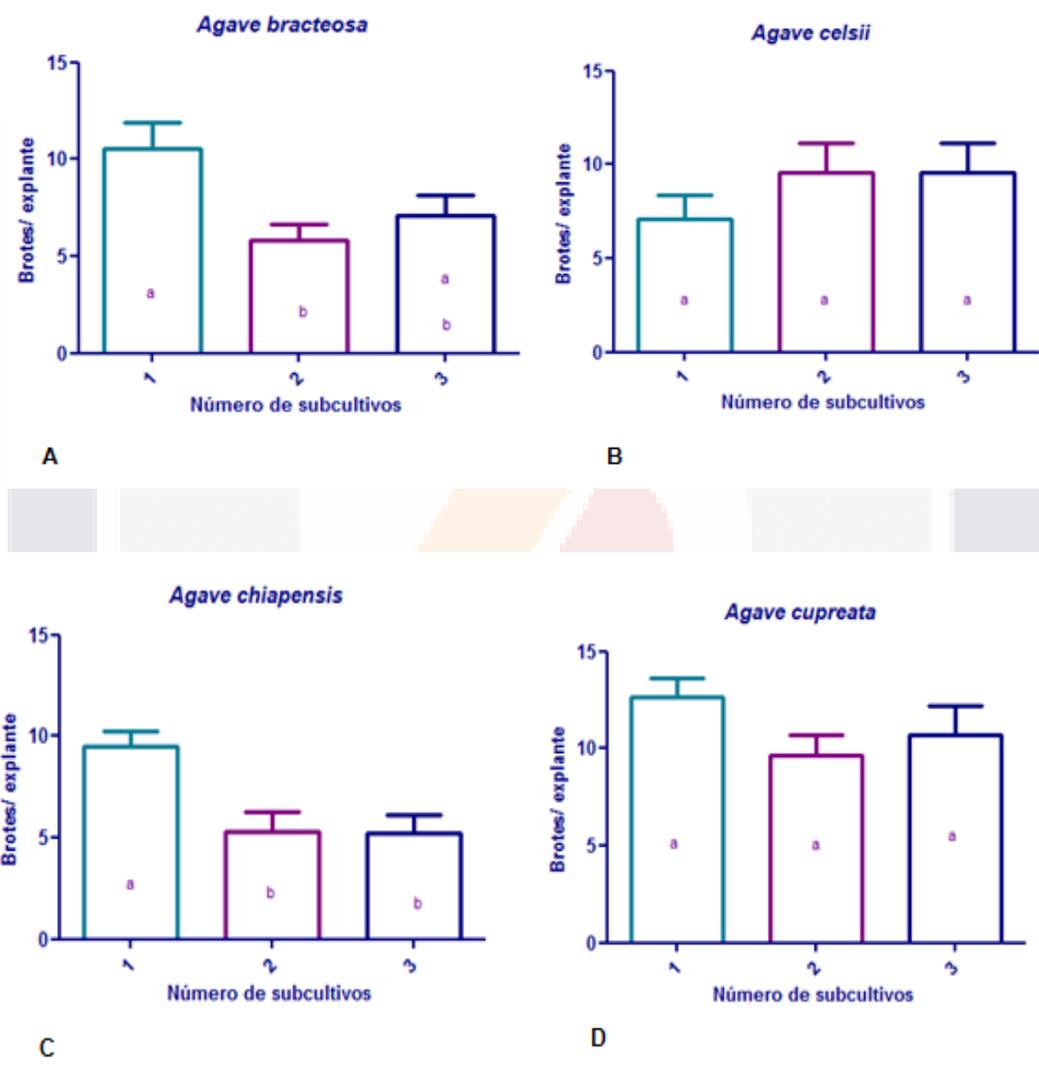


Figura 5. Resultados de los experimentos de propagación en A) *Agave bracteosa*, B) *A. celsii*, C) *A. chiapensis*, D) *A. cupreata*. Resultados obtenidos con los explantes basales. Las líneas de error muestran el error estándar. Letras iguales señalan tratamientos en los que no existen diferencias y letras diferentes significan tratamientos diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

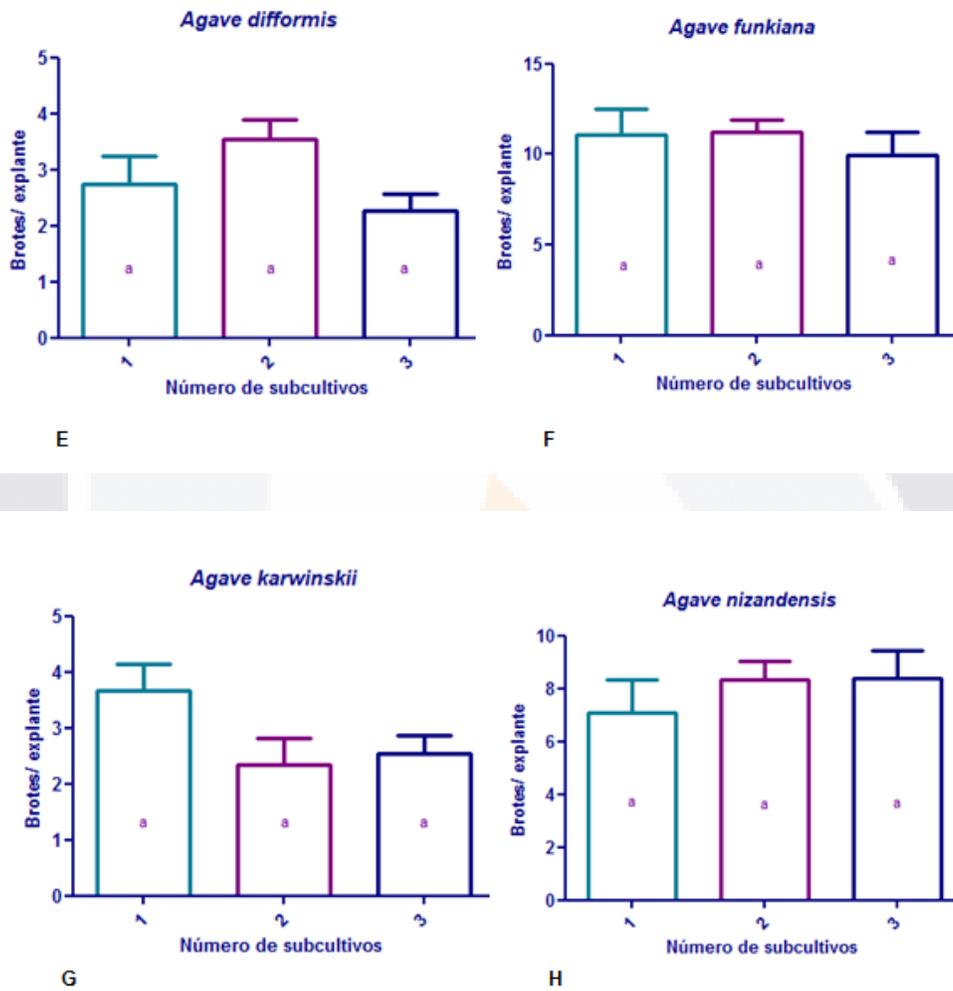


Figura 6. Resultados de los experimentos de propagación en E) *Agave difformis*, F) *A. funkiana*, G) *A. karwinskii*, H) *A. nizandensis*. Resultados obtenidos con los explantes basales. Las líneas de error muestran el error estándar. Letras iguales señalan tratamientos en los que no existen diferencias y letras diferentes significan tratamientos diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

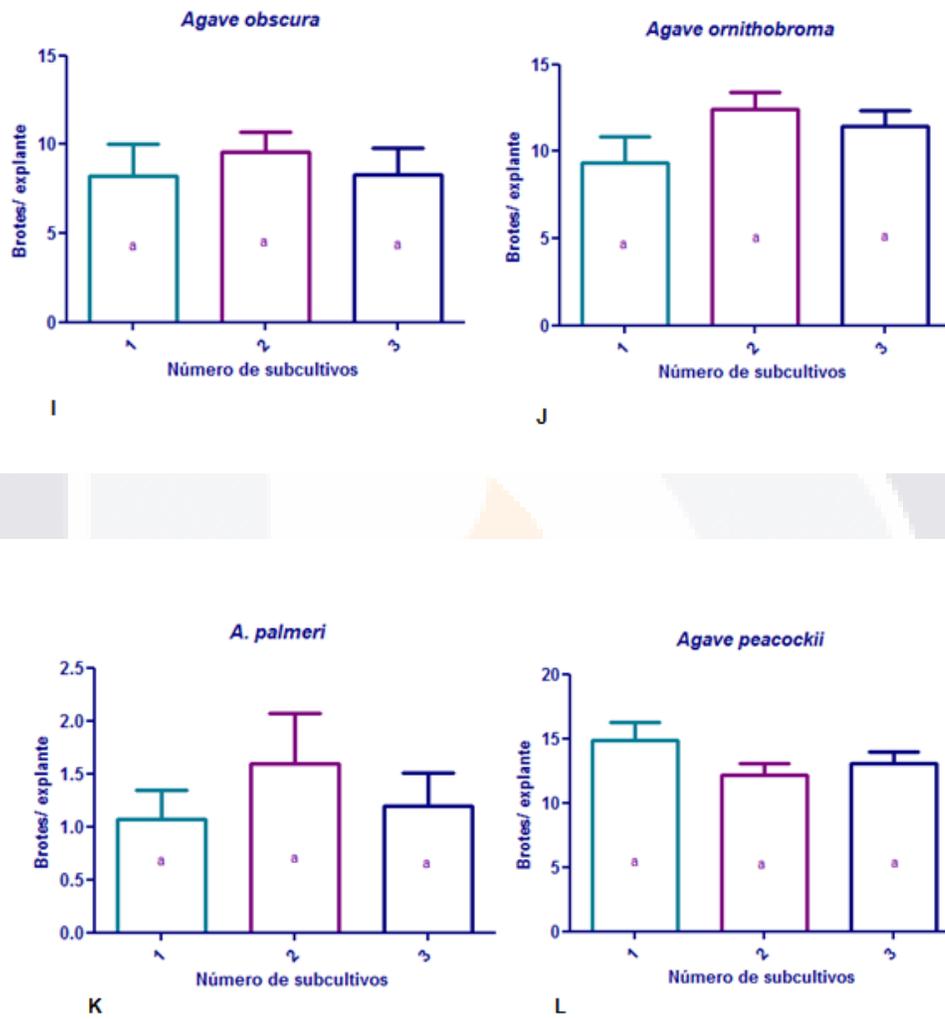


Figura 7. Resultados de los experimentos de propagación en I) *Agave obscura*, J) *A. ornithobroma*, K) *A. palmeri*, L) *A. peacockii*. Resultados obtenidos con los explantes basales. Las líneas de error muestran el error estándar. Letras iguales señalan tratamientos en los que no existen diferencias y letras diferentes significan tratamientos diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

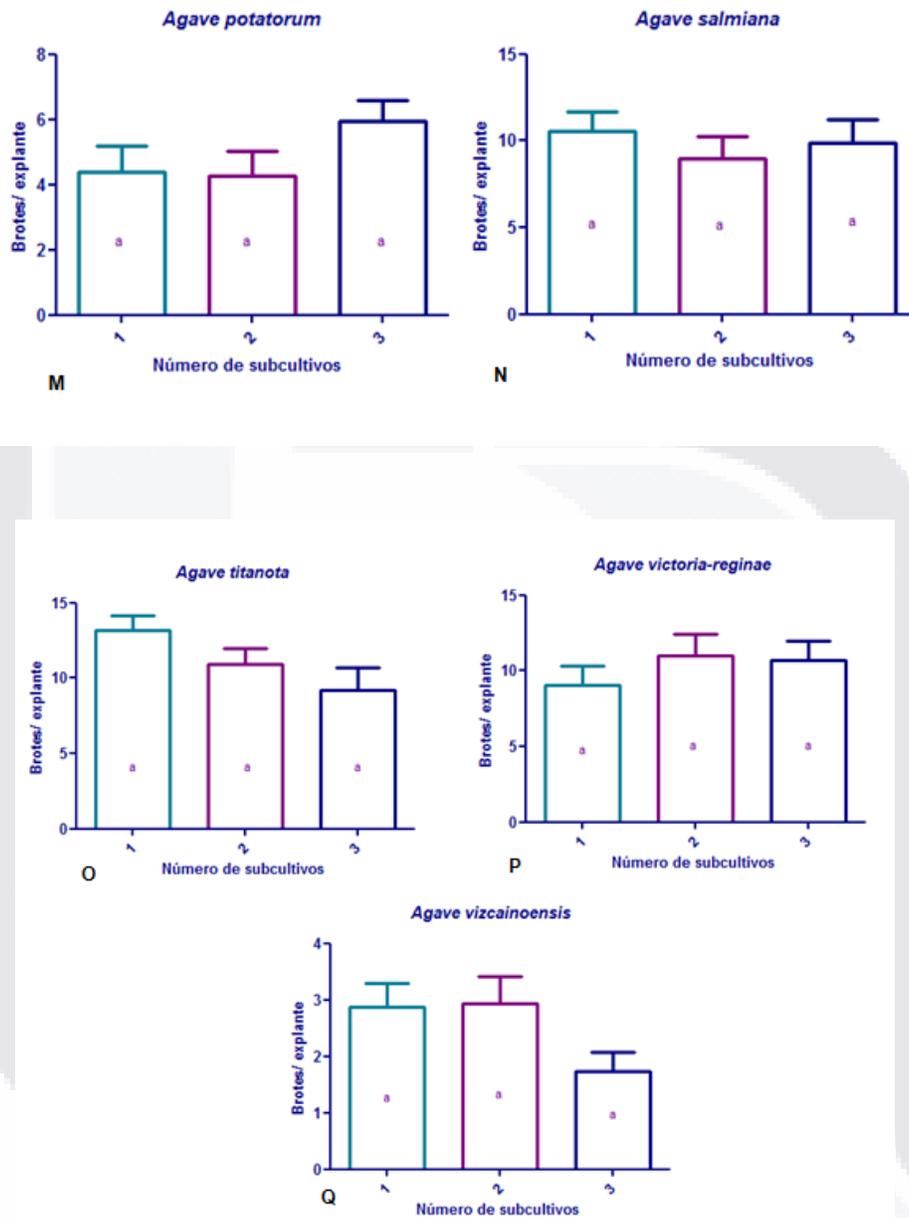


Figura 8. Resultados de los experimentos de propagación en M) *A. potatorum*, N) *A. salmiana*, O) *A. titanota* P) *A. victoria-reginae*, Q) *A. vizcainoensis*. Resultados obtenidos con los explantes basales. Las líneas de error muestran el error estándar. Letras iguales señalan tratamientos en los que no existen diferencias y letras diferentes significan tratamientos diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

Método de cultivo *in vitro* convencional

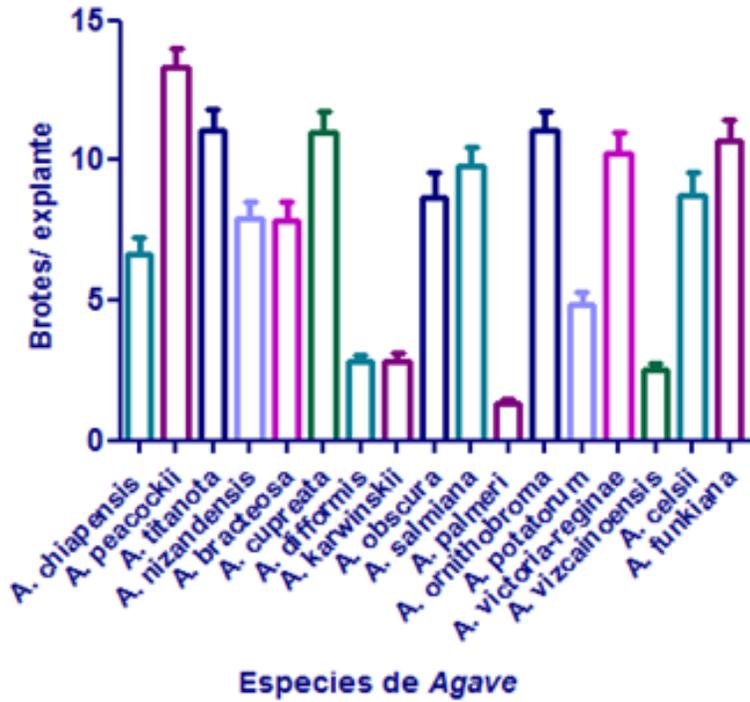


Figura 9. Resultados de los experimentos de las tres repeticiones realizadas a través de método de cultivo *in vitro* convencional para *Agave bracteosa*, *A. celsii*, *A. chiapensis*, *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. funkiana*, *A. karwinskii*, *A. nizandensis*, *A. obscura*, *A. ornithobroma*, *A. palmeri*, *A. peacockii*, *A. potatorum*, *A. salmiana*, *A. titanota*, *A. victoria-reginae*, *A. vizcainoensis*. Resultados obtenidos con los explantes basales. Las líneas de error muestran el error estándar. Letras iguales señalan tratamientos en los que no existen diferencias y letras diferentes significan tratamientos diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

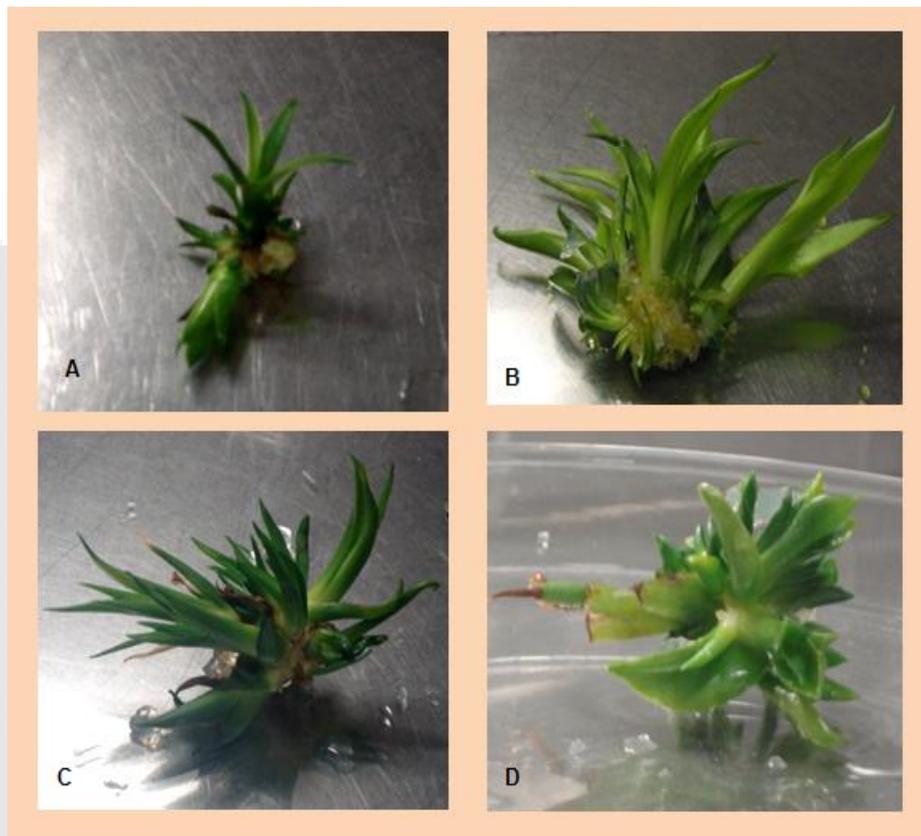


Figura 10. De izquierda a derecha generación de brotes en explantes basales cultivados en medio con citocininas A) *A. bracteosa*, B) *A. celsii*, C) *A. chiapensis*, D) *A. cupreata*.

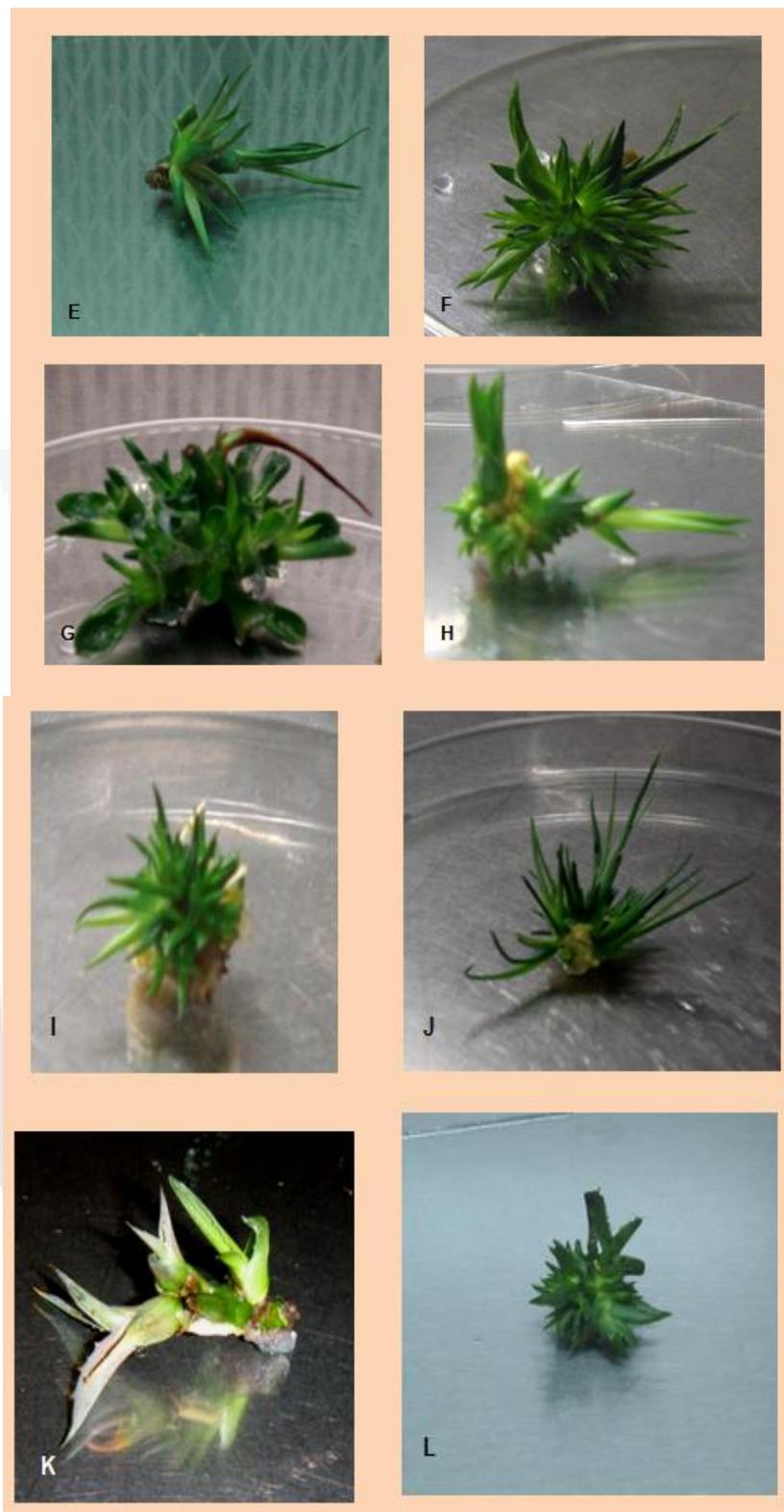


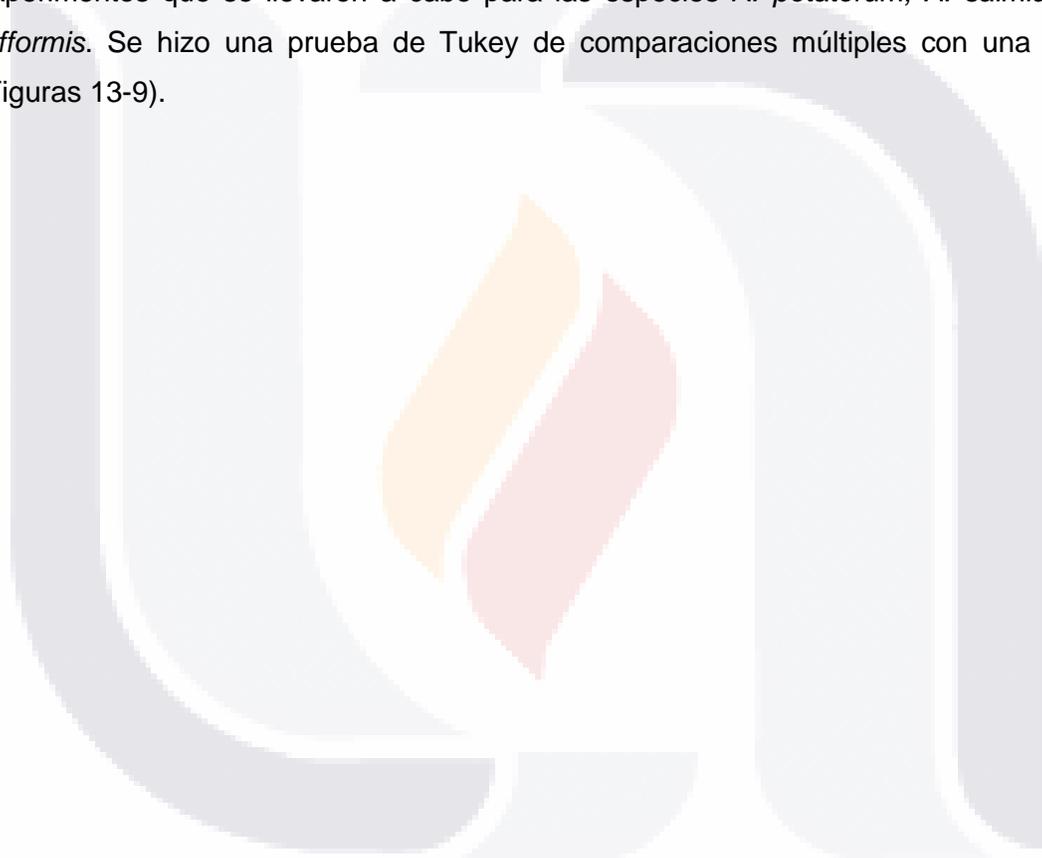
Figura 11. De izquierda a derecha generación de brotes en explantes basales cultivados en medio con citocininas E) *A. difformis*, F) *A. funkiana*, G) *A. karwinskii*, H) *A. nizandensis* I) *A. obscura*, J) *A. ornithobroma*, K) *A. palmeri*, L) *A. peacockii*.



Figura 12. De izquierda a derecha generación de brotes en explantes basales cultivados en medio con citocininas. M) *A. potatorum*, N) *A. salmiana*, O) *A. titanota*, P) *A victoria-reginae* Q) *A. vizcainoensis*.

## 7.2. PROPAGACIÓN DE TRES ESPECIES DE AGAVE EN UN SISTEMA COMERCIAL DE INMERSIÓN TEMPORAL

Se seleccionaron las especies *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis* para ser propagadas en Sistemas de Inmersión Temporal RITA®. Estas especies se seleccionaron de acuerdo al número de brotes así como a la calidad que presentaron en los resultados obtenidos de la multiplicación en cultivo *in vitro* convencional. Se realizó un Análisis de varianza (ANOVA) con una  $P < 0.05$  para obtener el promedio de brotes por explante en los experimentos que se llevaron a cabo para las especies *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis*. Se hizo una prueba de Tukey de comparaciones múltiples con una  $P < 0.05$ . (Figuras 13-9).



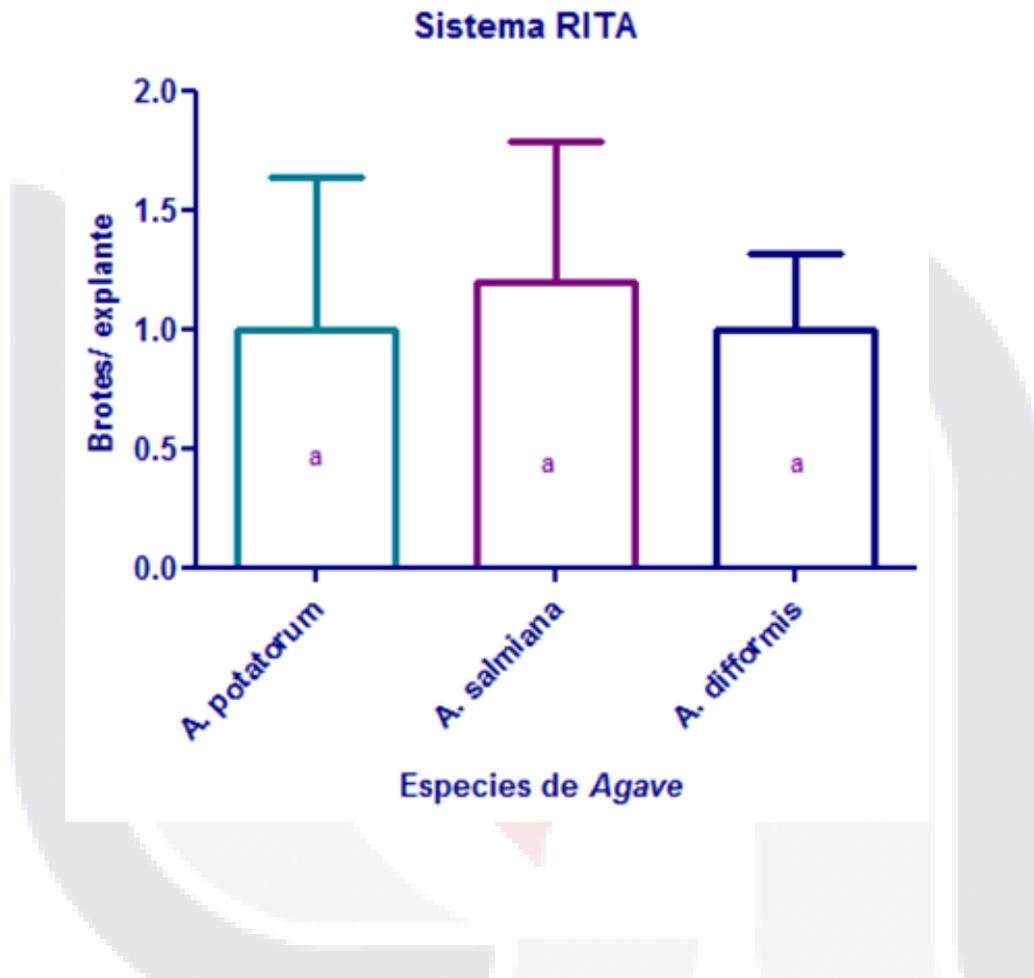


Figura 13. Resultados de los experimentos de propagación en Sistema RITA® para las especies *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis*; el tiempo de inmersión establecido fue de 5 minutos y la frecuencia de inmersión fue de cada 12 horas. Resultados obtenidos con los explantes basales. Las líneas de error muestran el error estándar. Letras iguales señalan tratamientos en los que no existen diferencias y letras diferentes significan tratamientos diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).



Figura 14. Resultados de los experimentos de propagación en Sistema RITA® para las especies *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis*; el tiempo de inmersión establecido fue de 10 minutos y la frecuencia de inmersión fue de cada 6 horas. Resultados obtenidos con los explantes basales. Las líneas de error muestran el error estándar. Letras iguales señalan tratamientos en los que no existen diferencias y letras diferentes significan tratamientos diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

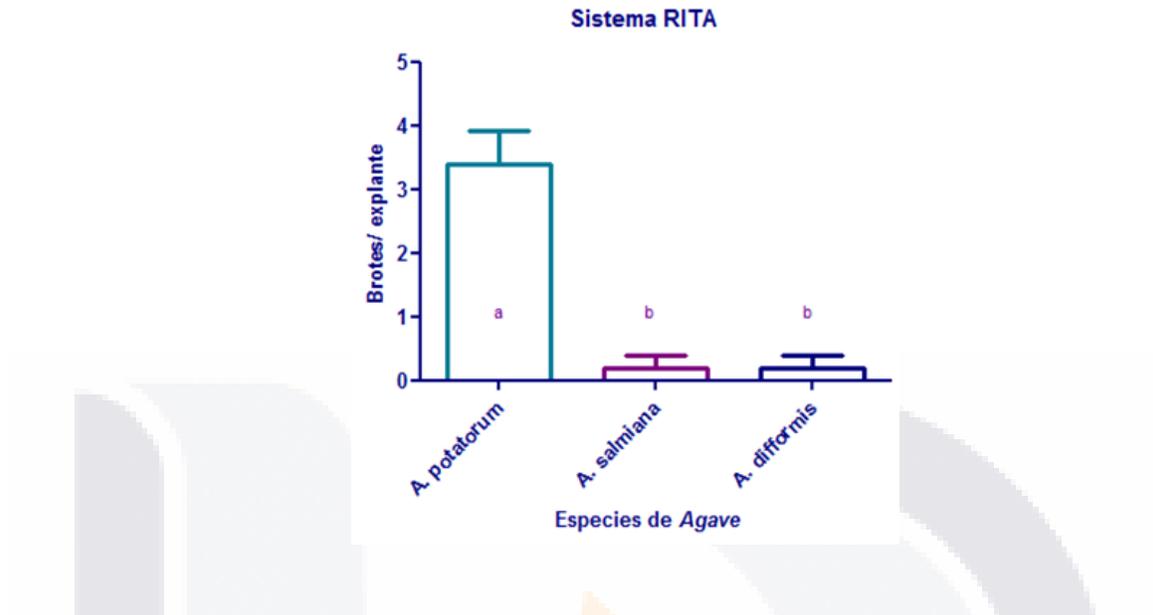


Figura 15. Resultados de los experimentos de propagación en Sistema RITA® para las especies *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis*; el tiempo de inmersión establecido fue de 15 minutos y la frecuencia de inmersión fue de cada 3 horas. Resultados obtenidos con los explantes basales. Las líneas de error muestran el error estándar. Letras iguales señalan tratamientos en los que no existen diferencias y letras diferentes significan tratamientos diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

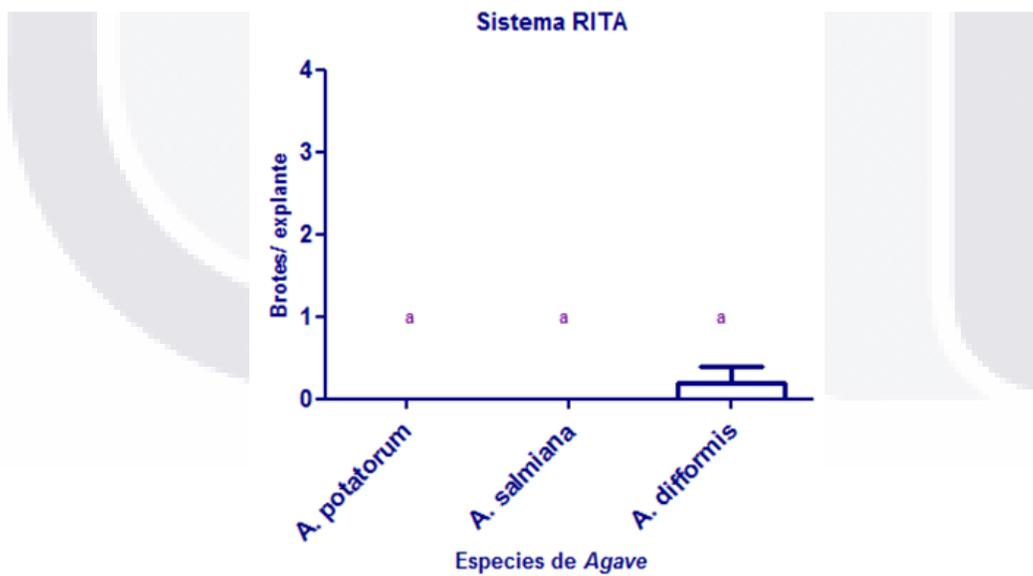


Figura 16. Resultados de los experimentos de propagación en Sistema RITA® para las especies *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis*; el tiempo de inmersión establecido fue de 20 minutos y la frecuencia de inmersión fue de cada 8 horas. Resultados obtenidos con los explantes basales. Las líneas de error muestran el error estándar. Letras iguales señalan tratamientos en los que no existen diferencias y letras diferentes significan tratamientos diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

En las figuras (17-20) se muestra el desarrollo de los explantes en los sistemas de inmersión temporal RITA®. Se puede observar como el explante va creciendo y en la mayoría de los casos se obtuvo brotes para los explantes de las especies *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis* a los diferentes tiempos y frecuencias de inmersión. Los datos fueron obtenidos diariamente, sin embargo en las figuras se muestran los resultados por semana, ya que cada experimento se montó durante 50 días.

La especie *A. potatorum* con tiempos y frecuencias de inmersión de 5 minutos cada 12 horas obtuvo un promedio de 1.0 brotes por explante y comenzó a producir brotes a partir del día 27, para cada 10 minutos de inmersión cada 6 horas se obtuvo un promedio de 3.0 brotes y una proliferación a partir del día 20, para cada 15 minutos de inmersión cada 3 horas se obtuvo un promedio de 3.4 brotes Y una proliferación a partir del día 16. En el tiempo y frecuencia de inmersión de 20 minutos cada 8 horas no se obtuvo brotación.

*A. salmiana* con 5 minutos de inmersión cada 12 horas obtuvo un promedio de 1.2 brotes por explante, la brotación se obtuvo a partir del día 29, para los tiempos de inmersión de 10 minutos cada 6 horas no se obtuvo brotación, si hubo crecimiento de los explantes. Para los tiempos de inmersión de cada 15 minutos cada 3 horas el promedio de brotes por explante fue de 0.2 y la brotación comenzó a partir del día 14. En el tiempo y frecuencia de inmersión de 20 minutos cada 8 horas no se obtuvo brotación, si hubo crecimiento de explantes. *A. difformis* con tiempo de inmersión durante 5 minutos cada 12 horas obtuvo un promedio de brotes por explante de 1.0 y la brotación comenzó a partir del día 21, en los tiempos de inmersión de 10 minutos cada 6 horas el promedio de brotes fue de 1.2 A partir del día 14 se apreció la aparición de brotes, para los tiempos de 15 minutos cada 3 horas el promedio fue de 0.2 y la brotación comenzó a partir del día 45. Para el tiempo y frecuencia de inmersión de 20 minutos cada 8 horas se obtuvo un promedio de 0.2 brotes por explante y la brotación comenzó a partir del día 21.

A los 50 días de haber sido transferidos los meristemos basales para cada tratamiento, se realizó el conteo de los brotes obtenidos para cada explante. La calidad de las plantas fue buena, así como los brotes que se produjeron.

Para los experimentos que se llevaron a cabo con el sistema de inmersión temporal comercial, se realizó una grafica de cinética de crecimiento para determinar a partir de cual día comenzó la proliferación de los explantes. Figuras 21-23



Figura 17. Explantes de *A. difformis* y *A. potatoorum*, se utilizó biorreactor RITA® con un tiempo de inmersión de 5 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 12 horas con 200 mL de medio MS líquido con  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ y  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  CIN respectivamente. A) Explantes de *A. difformis* en la primer semana; B) Explantes de *A. difformis* en la segunda semana; C) Semana 3 se observa crecimiento de los explantes y de brotes para *A. difformis*; D) Explante de *A. difformis* después de 50 días. E) Explantes con brotes de *A. potatoorum* a partir de la sexta semana F) Explantes de *A. potatoorum* después de 50 días.



Figura 18. Explantes de *A. potatorum*, *A. difformis* y *A. salmiana*, se utilizó biorreactor RITA® con un tiempo de inmersión de 10 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 6 horas; 200 mL de medio MS líquido con 3.0 mg L<sup>-1</sup> CIN, 0.2 mg L<sup>-1</sup> TDZ y 0.1 mg L<sup>-1</sup> TDZ respectivamente. A) Explante de *A. potatorum* en la cuarta semana; B) Explante con brotes de *A. potatorum* a partir de la sexta semana; C) Explantes de *A. potatorum* a los 50 días de tratamiento; D) Explantes con brotes de *A. potatorum* después de 50 días de haber estado en Biorreactor RITA®; E) Explante con brote de *A. difformis* después de 50 días de tratamiento 5; F) Explantes de *A. salmiana* sin brotes después de 50 días de tratamiento

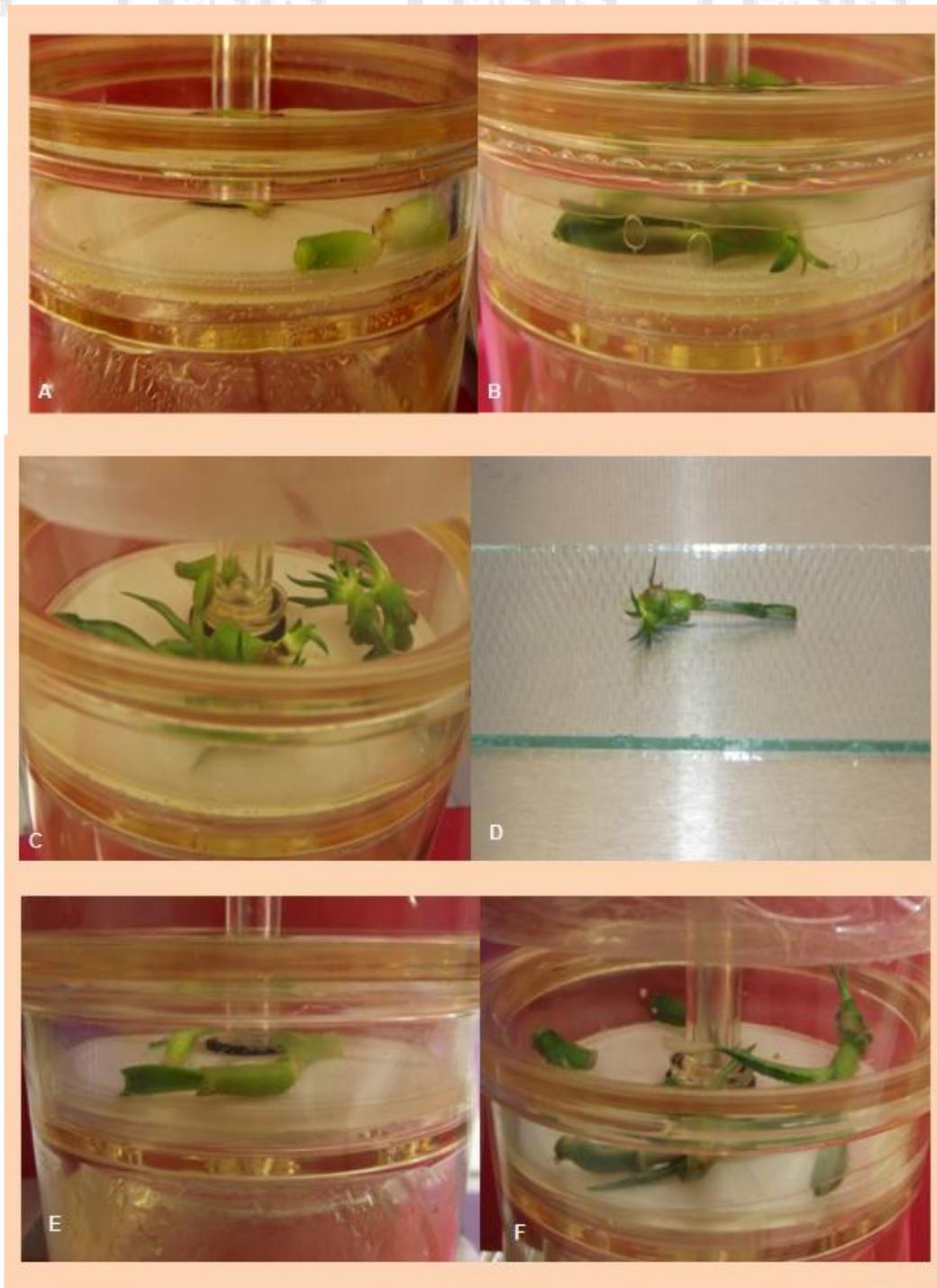


Figura 19. Explantes de *A. potatozum* y *A. salmiana*, se utilizó biorreactor RITA® con un tiempo de inmersión de 15 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 3 horas; 200 mL de medio MS líquido con 3.0 mg L<sup>-1</sup> CIN y 0.1 mg L<sup>-1</sup> TDZ respectivamente. A) Explantes de *A. potatozum* en la primer semana de tratamiento; B) Explantes con brotes de *A. potatozum* observados en la cuarta semana; C) Explantes con crecimiento de brotes de *A. potatozum* a partir de la séptima semana; D) Explante con brotes de *A. potatozum* a los cincuenta días de tratamiento; E) Explantes de *A. salmiana* a partir de la segunda semana de tratamiento F) Explantes de *A. salmiana* con brotes observados en la octava semana de tratamiento

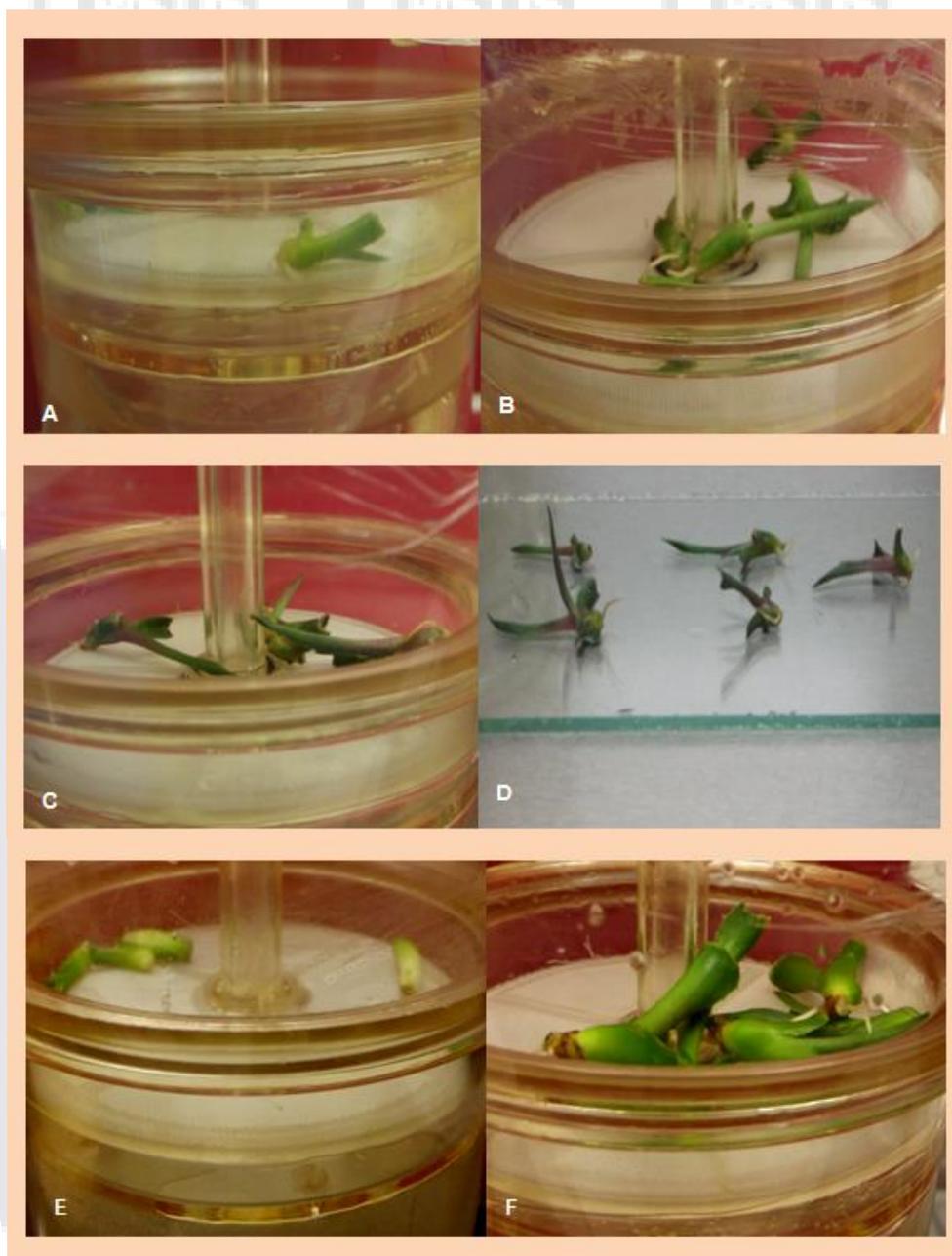


Figura 20. Explantes de *A. salmiana* y *A. potatoorum*, se utilizó biorreactor RITA® con un tiempo de inmersión de 20 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 8 horas; 200 mL de medio MS líquido con  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ y  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  CIN respectivamente. A) Explantes de *A. salmiana* en la segunda semana de tratamiento; B) Explantes de *A. salmiana* observados en la cuarta semana; C) Crecimiento de explantes de *A. salmiana* a observados en la séptima semana; D) Explante de *A. salmiana* a los cincuenta días de tratamiento; E) Explantes de *A. potatoorum* a partir de la primer semana de tratamiento F) Crecimiento de explantes de *A. potatoorum* con observados en la cuarta semana de tratamiento

Tabla 5. Resultados del experimento de micropropagación de *Agave* con biorreactores de inmersión temporal RITA®. Se indica el tratamiento utilizado, número de experimentos realizados, porcentaje de brotación por cada experimento y número de brotes por explante por cada experimento. Las citocininas que se utilizaron fueron cinetina (CIN), tidiazurón (TDZ). n= 5

Especie	Tratamiento	Frecuencia de inmersión (h) /Tiempo de inmersión (min)	Brotación (%)	Brotos/Explante (media±ES)
<i>Agave potatorum</i>	3.0 CIN	12/5	40	1.00±0.63
		6/10	80	3.00±0.95
		3/15	100	3.40±0.51
<i>Agave salmiana</i>	0.1 TDZ	8/20	0	0.00±0.00
		12/5	60	1.20±0.58
		6/10	0	0.00±0.00
		3/15	20	0.20±0.20
		8/20	0	0.00±0.00
<i>Agave difformis</i>	0.2 TDZ	12/5	80	1.00±0.32
		6/10	80	1.20±0.49
		3/15	20	0.20±0.20
		8/20	20	0.20±0.20

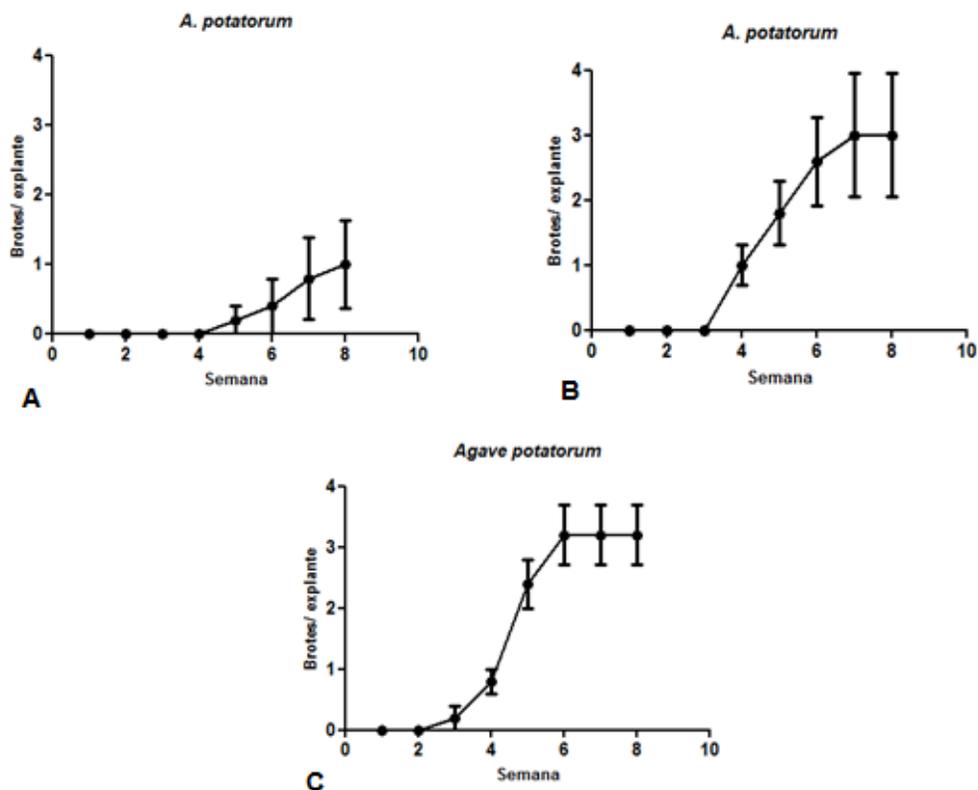


Figura 21. Cinética de aparición de brotes en *A. potatorum* donde se señala a partir de que semana comenzó la brotación (cada semana constó de 7 días aproximadamente). A) tiempo de inmersión 5 minutos y frecuencia de inmersión cada 12 horas, la brotación comenzó a partir de la 5ª semana después de haber sido transferido los explantes al sistema RITA®. B) tiempo de inmersión 10 minutos y frecuencia de inmersión cada 6 horas, la brotación comenzó a partir de la 4ª semana. C) tiempo de inmersión 15 minutos y frecuencia de inmersión cada 3 horas, la brotación comenzó en la 3ª semana.

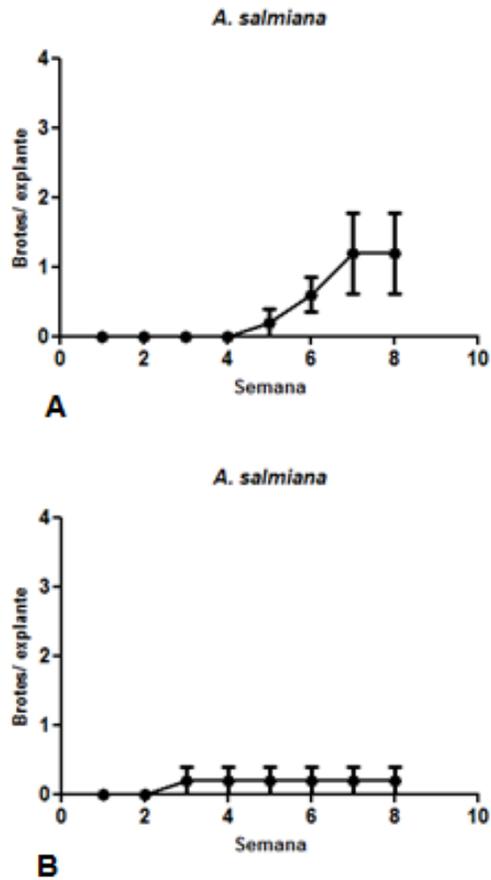


Figura 22. Cinética de crecimiento en *A. salmiana* donde se señala a partir de que semana comenzó la brotación (cada semana constó aproximadamente de 7 días). A) tiempo de inmersión 5 minutos y frecuencia de inmersión cada 12 horas, la brotación comenzó a partir de la 5ª semana después de haber sido transferido los explantes al sistema RITA®. B) tiempo de inmersión 15 minutos y frecuencia de inmersión cada 3 horas, la brotación comenzó a partir de la 3ª semana.

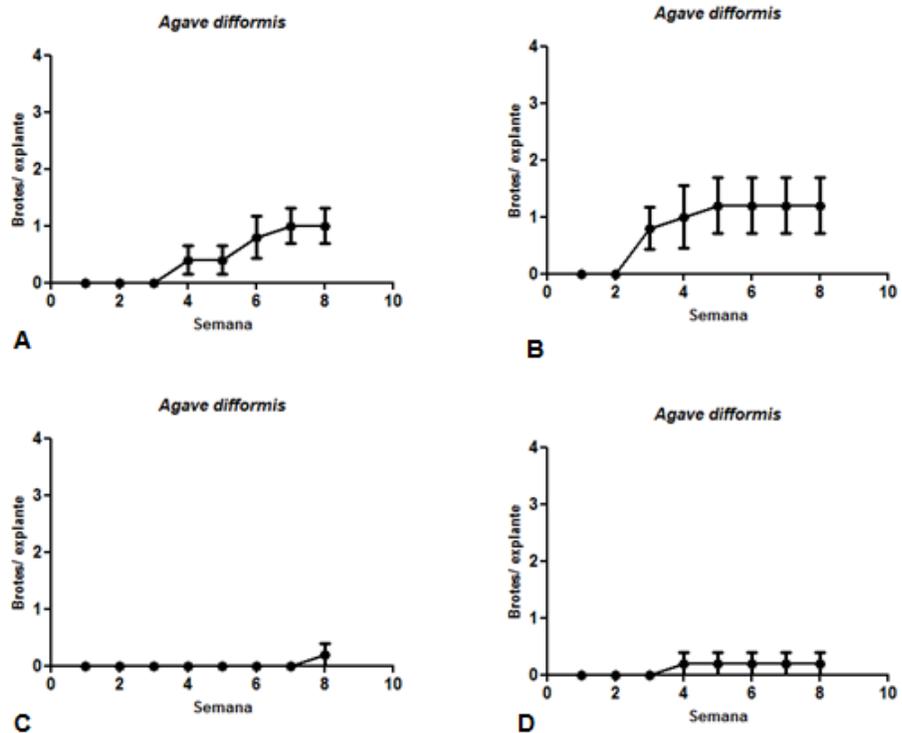


Figura 23. Cinética de crecimiento en *A. difformis* donde se señala a partir de que semana comenzó la brotación (cada semana constó aproximadamente de 7 días). A) tiempo de inmersión 5 minutos y frecuencia de inmersión cada 12 horas, la brotación comenzó a partir de la 4ª semana después de haber sido transferido los explantes al sistema RITA®. B) tiempo de inmersión 10 minutos y frecuencia de inmersión cada 6 horas, la brotación comenzó a partir de la 3ª semana. C) tiempo de inmersión 15 minutos y frecuencia de inmersión cada 3 horas, la brotación comenzó en la 8ª semana.

### 7.3. CONSTRUCCIÓN DE UN SISTEMA ALTERNATIVO DE INMERSIÓN TEMPORAL Y PRUEBA DE SU EFICIENCIA CON TRES ESPECIES DE AGAVE

Se seleccionaron las especies *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis* para ser propagadas en Sistemas de inmersión temporal alterno El tiempo de inmersión utilizado fue de 5 minutos con una frecuencia de inmersión de 12 horas. Se realizó un Análisis de varianza (ANOVA) con una  $P < 0.05$  para obtener el promedio de brotes por explante en el experimento que se llevo a cabo para las especies *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis*. Se hizo una prueba de Tukey de comparaciones múltiples con una  $P < 0.05$ . (Figura 24).

De los resultados obtenidos para *A. potatorum* se observó la aparición de brotes a partir de la 4ª semana, en el caso de *A. salmiana* fue a partir de la 3ª semana y en *A. difformis* fue a partir de la 3ª semana (Figuras 26-31).

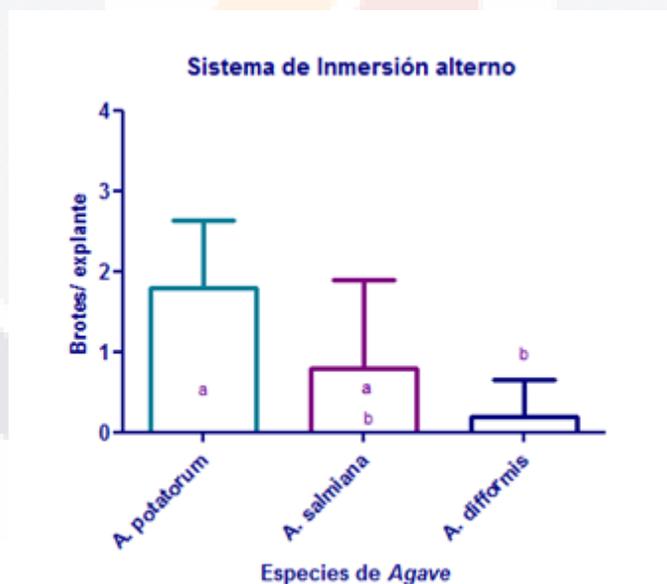


Figura 24. Resultados de los experimentos de propagación en Sistema de Inmersión temporal alterno en *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis*. Con un tiempo de inmersión de 5 minutos y frecuencia de inmersión cada 24 horas. Resultados obtenidos con los explantes basales. Las líneas de error muestran el error estándar. Letras iguales señalan tratamientos en los que no existen diferencias y letras diferentes significan tratamientos diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

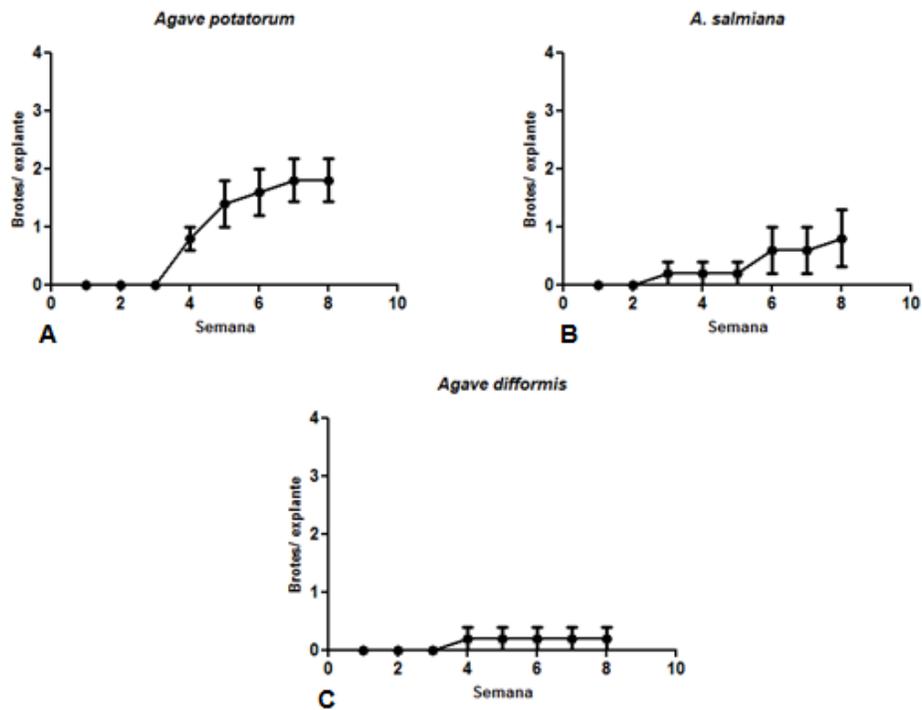


Figura 25. Cinética de aparición de brotes en *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis* donde se señala a partir de que semana comenzó la brotación (cada semana constó aproximadamente de 7 días). Frecuencia de inmersión cada 24 horas con un tiempo de inmersión de 5 minutos. A) *A. potatorum*, la brotación comenzó a partir de la 4ª semana después de haber sido transferido los explantes al sistema alterno. B) *A. salmiana*, la brotación comenzó a partir de la 3ª semana. C) *A. difformis*, la brotación comenzó en la 4ª semana.

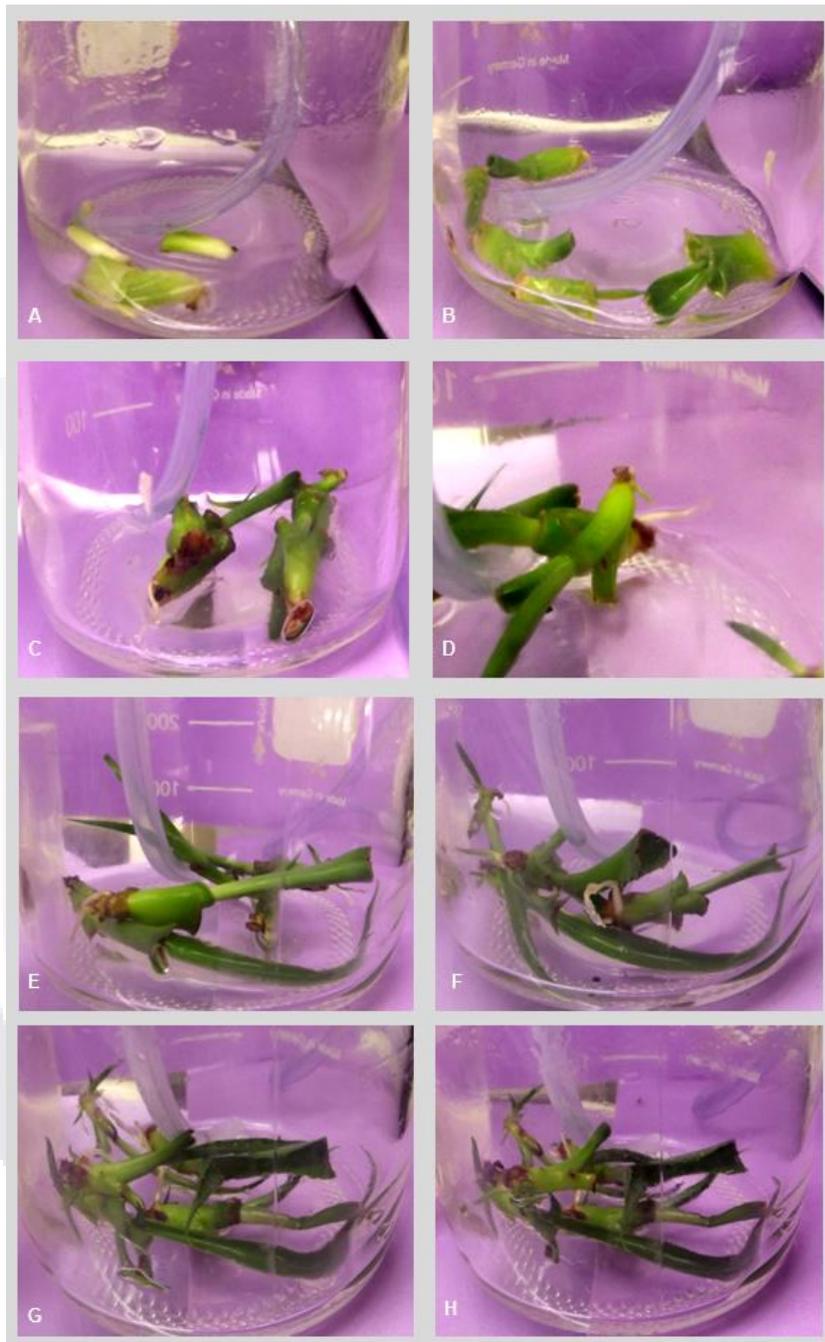


Figura 26. Explantes de *A. potatorum*, se utilizó Sistema de Inmersión alterno con un tiempo de inmersión de 5 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 24 horas con 200 mL de medio MS líquido y  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  CIN. A) Semana 1 B) Semana 2 crecimiento de explantes C) Semana 3 crecimiento de explante D) Semana 4 generación de brotes en explantes E) Semana 5 generación de brotes en explantes F) Semana 6 crecimiento de brotes G) Semana 7 crecimiento de brotes H) Semana 8 crecimiento de brotes



Figura 27. Después de 50 días en Sistema de Inmersión alterno con un tiempo de inmersión de 5 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 24 horas se observa brotes en explantes de *A. potatozum*, se utilizó 200 mL de medio MS líquido con  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  CIN.

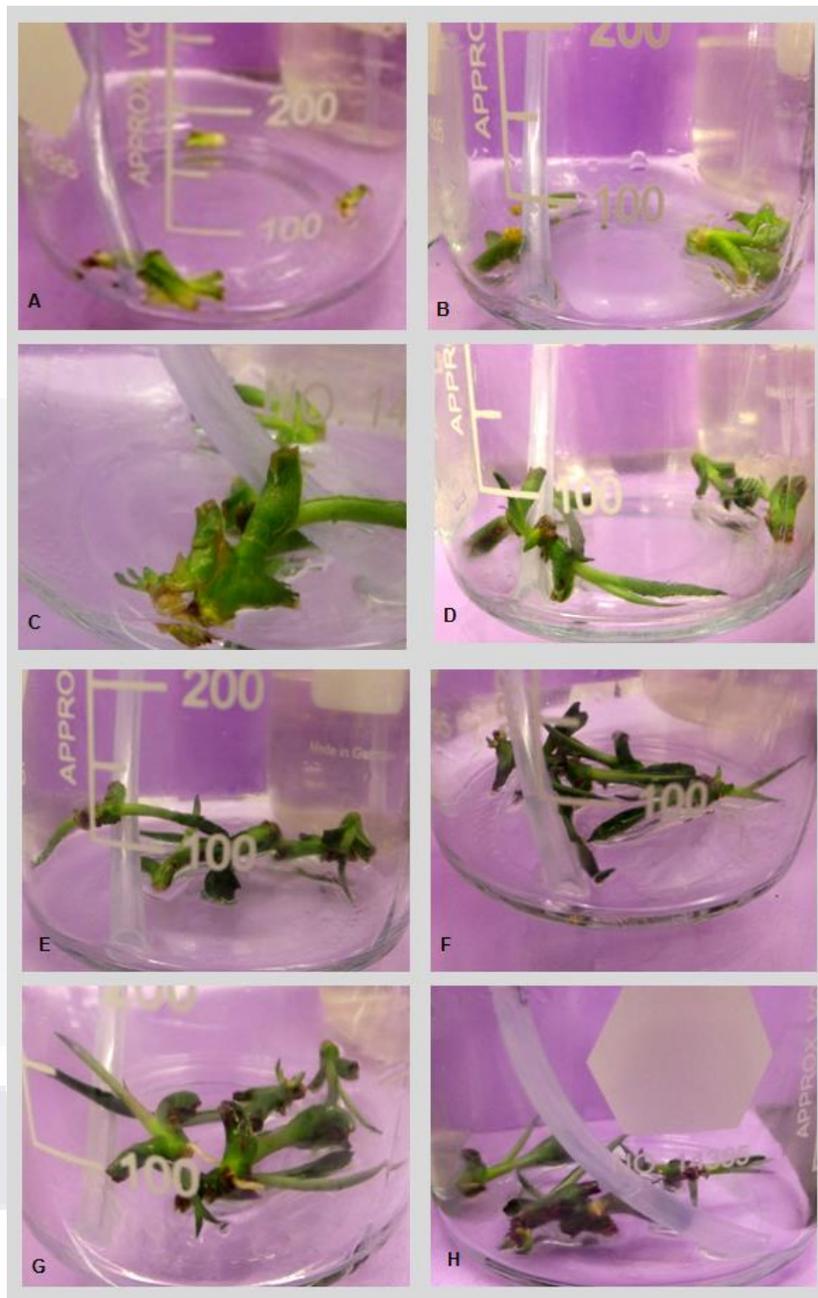


Figura 28. Explantes de *A. salmiana*, se utilizó Sistema de Inmersión Temporal alterno con un tiempo de inmersión de 5 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 24 horas 200 mL de medio MS líquido con  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ. A) Semana 1; B) Semana 2; C) Semana 3 generación de brote en explante D) Semana 4 crecimiento de explantes; E) Semana 5 crecimiento de explantes; F) Semana 6 generación de brote en explante; G) Semana 7 crecimiento de brotes en explantes H) Semana 8



Figura 29. Después de 50 días en Sistema de Inmersión alterno con un tiempo de inmersión de 5 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 24 horas se observa brotes en explantes de *A. salmiana*, se utilizó 200 mL de medio MS líquido con  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ.

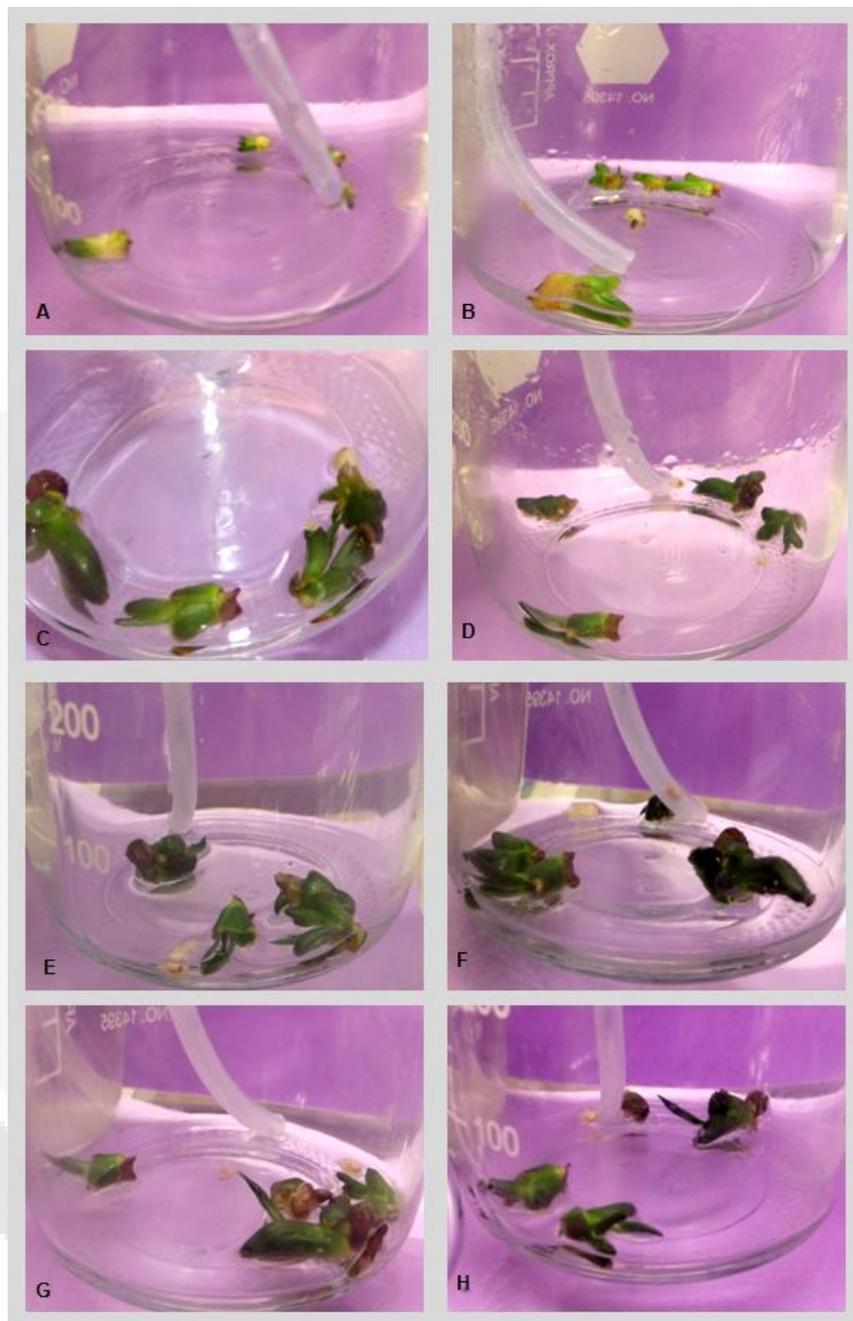


Figura 30. Explantes de *A. difformis*, se utilizó Sistema de Inmersión Temporal alterno con un tiempo de inmersión de 5 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 24 horas. 200 mL de medio MS líquido con  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ. A) Semana 1; B) Semana 2 crecimiento de explantes; C) Semana 3 generación de brote en explante D) Semana 4 crecimiento de explantes; E) Semana 5 crecimiento de explantes; F) Semana 6 crecimiento de explantes; G) Semana 7 H) Semana 8

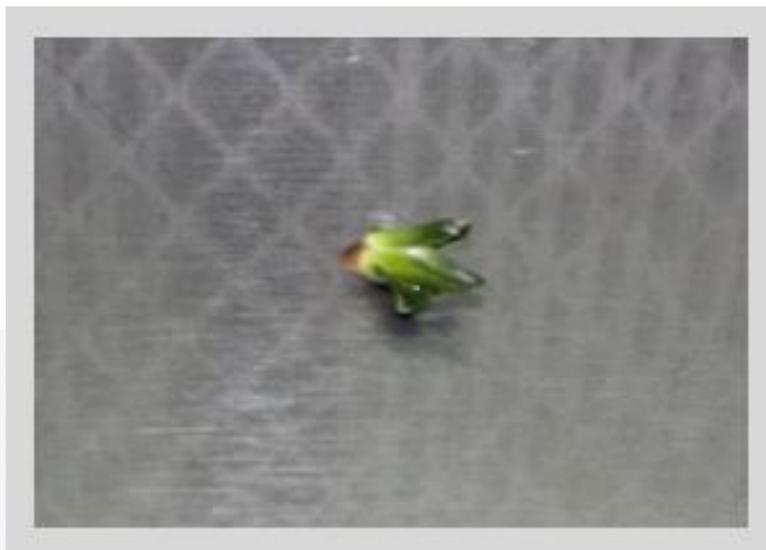


Figura 31. Después de 50 días en Sistema de Inmersión alterno con un tiempo de inmersión de 5 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 12 horas se observa crecimiento de explante de *A. difformis*, se utilizó 200 mL de medio MS líquido con  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  TDZ.

**7.4. PROPAGAR LA ESPECIE AGAVE POTATORUM EN INMERSIÓN COMPLETA**

Se seleccionó la especie *A. potatorum* para ser propagada bajo Inmersión completa. El tiempo de inmersión fue de 50 días.

Los resultados para *A. potatorum* bajo las condiciones de inmersión completa en medio de cultivo líquido fueron que se presentó brotación a partir de la 4<sup>a</sup> semana (Figura 32). Se obtuvo una media de 2.6. Se puede observar que se presentó hiperhidratación en los explantes (Figura 34).

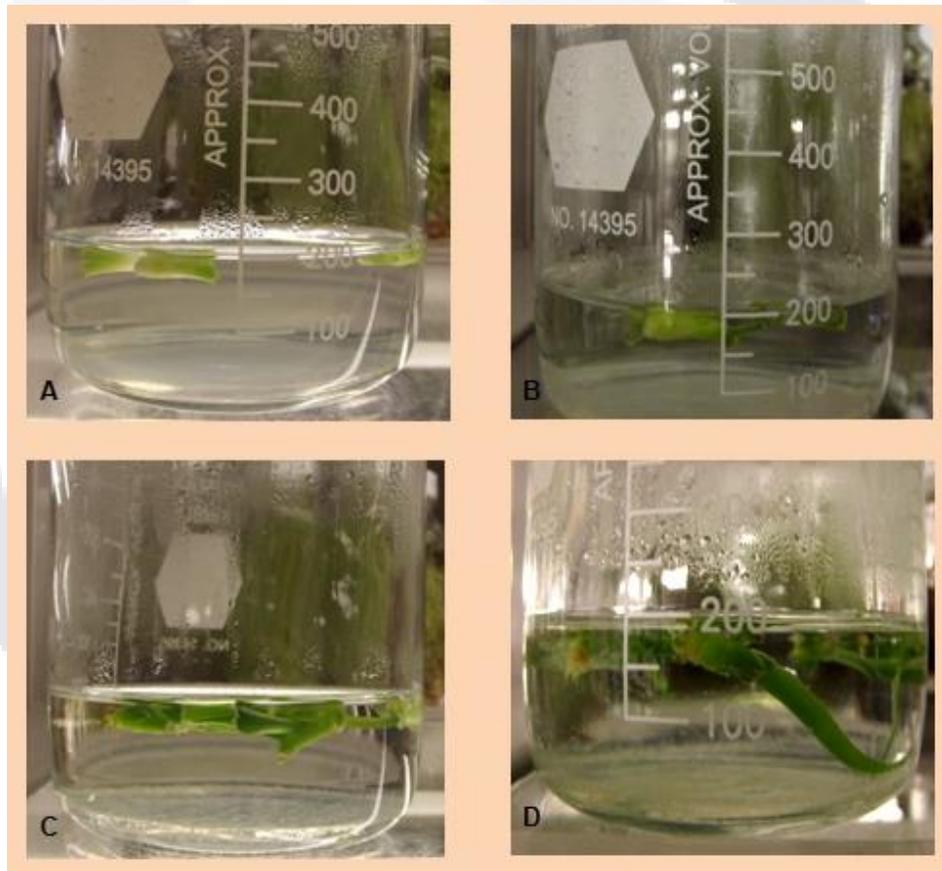


Figura 32. Explantes de *A. potatorum* en inmersión completa. Se utilizó 200 mL de medio MS líquido y 3.0 mg L<sup>-1</sup> CIN. A) Semana 1; B) Semana 2 crecimiento de explantes C) Semana 3 continúa crecimiento de los explantes; D) Semana 4 generación de brotes en explantes



Figura 33. Explantes de *A. potatorum* en inmersión completa. Se utilizó 200 mL de medio MS líquido y  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  CIN. E) Semana 5 generación de brotes en explantes; F) Semana 6 crecimiento de brotes y explantes G) Semana 7 crecimiento de brotes y explantes H) Semana 8 crecimiento de brotes y explantes



Figura 34. Después de 50 días en inmersión completa se observa brotes de explantes de *A. potatorum* donde se muestra hiperhidratación y deformación foliar. Se utilizó 200 mL de medio MS líquido con  $3.0 \text{ mg L}^{-1}$  CIN.

En las Figuras 35-37 se muestran la comparación de los resultados conseguidos en cuanto al número de brotes obtenidos para las especies *A. potatozum*, *A. salmiana* y *A. difformis* en los diferentes sistemas de cultivo *in vitro* que se emplearon.

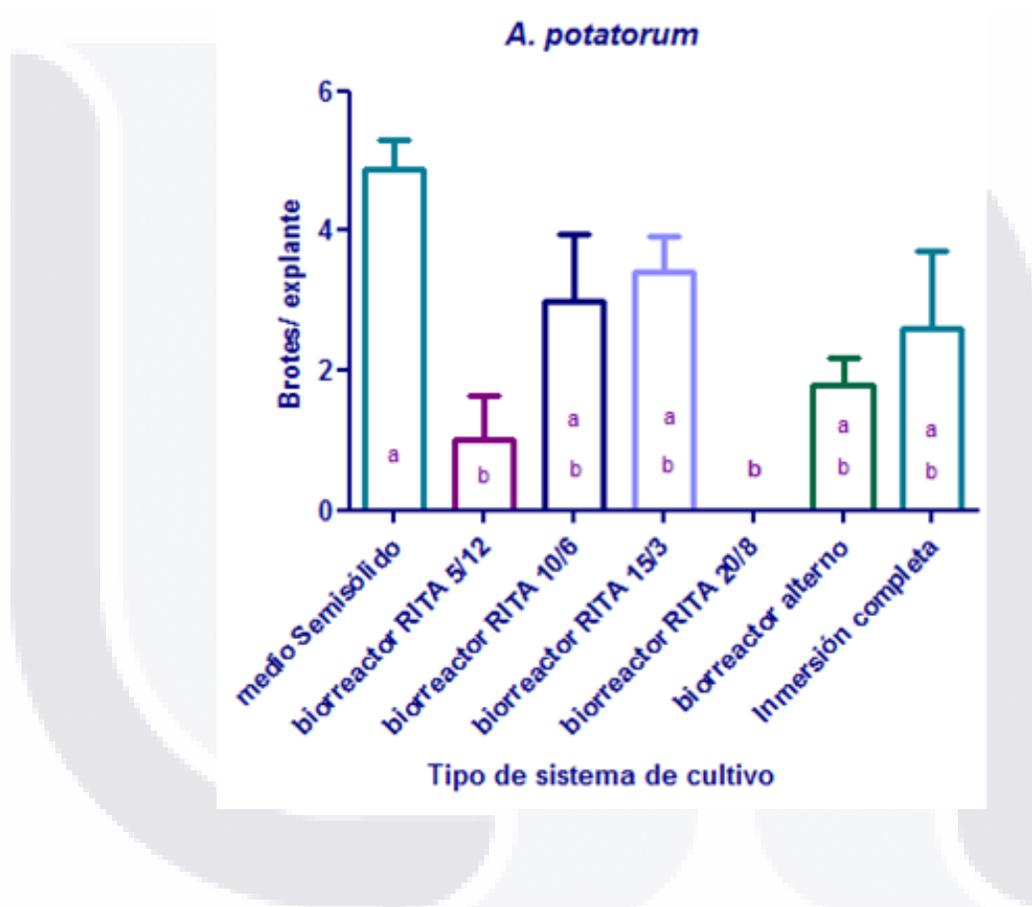


Figura 35. Resultados de los experimentos de propagación en los distintos sistemas utilizados para *A. potatozum*. Resultados obtenidos con los explantes basales. El tiempo (min) y frecuencia de inmersión (h) están separados por la línea diagonal para el biorreactor RITA®. Las líneas de error muestran el error estándar. Letras iguales señalan tratamientos en los que no existen diferencias y letras diferentes significan tratamientos diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

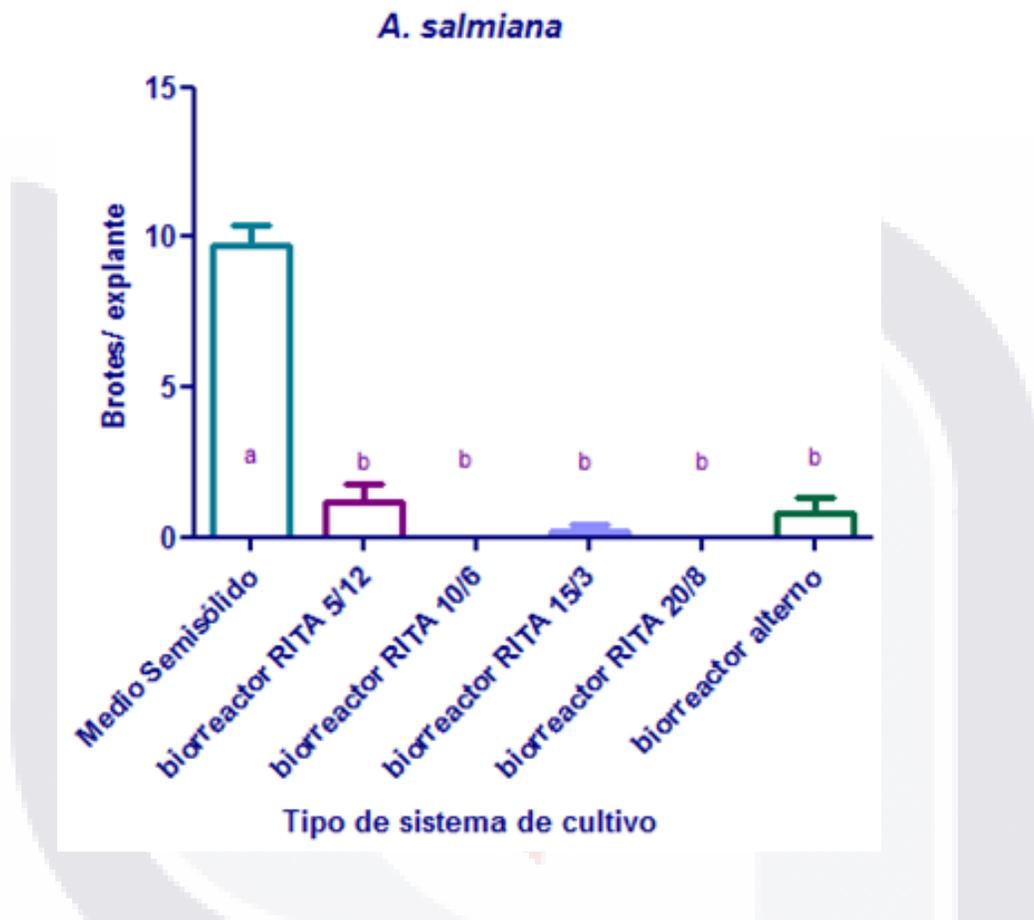


Figura 36. Resultados de los experimentos de propagación de los distintos sistemas utilizados para *A. salmiana*. Resultados obtenidos con los explantes basales. El tiempo (min) y frecuencia de inmersión (h) están separados por la línea diagonal para el biorreactor RITA®. Las líneas de error muestran el error estándar. Letras iguales señalan tratamientos en los que no existen diferencias y letras diferentes significan tratamientos diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

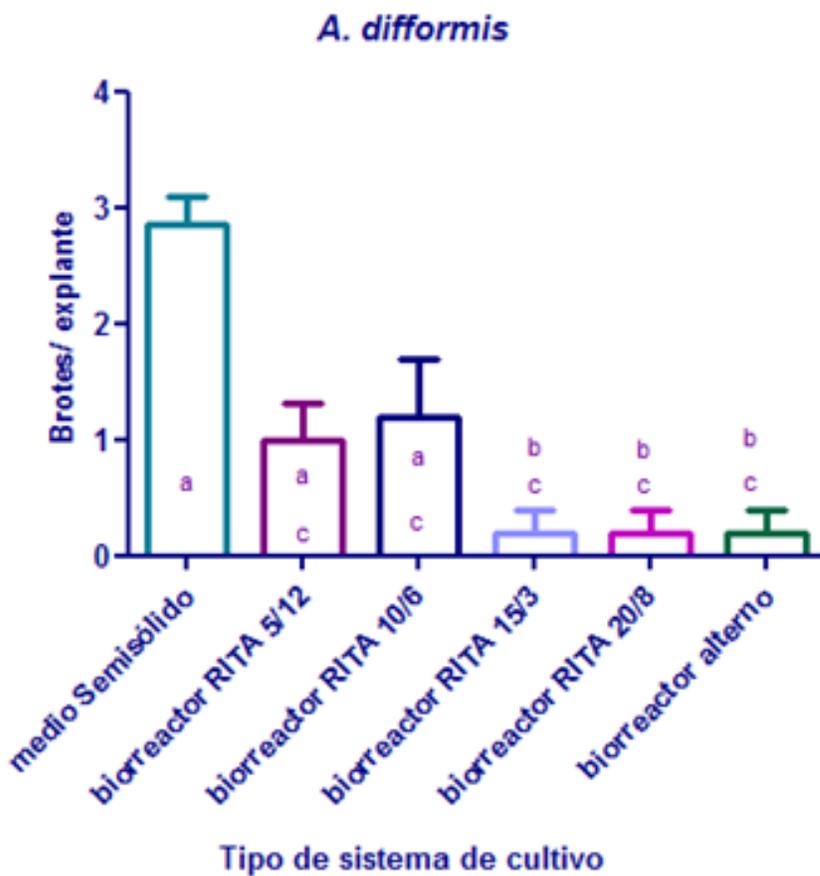


Figura 37. Resultados de los experimentos de propagación de los distintos sistemas utilizados para *A. difformis*. Resultados obtenidos con los explantes basales. El tiempo (min) y frecuencia de inmersión (h) están separados por la línea diagonal para el biorreactor RITA®. Las líneas de error muestran el error estándar. Letras iguales señalan tratamientos en los que no existen diferencias y letras diferentes significan tratamientos diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey Kramer ( $p < 0.05$ ).

### 7.5. ANÁLISIS DE LA CALIDAD DE PLANTAS, TIEMPO Y NÚMERO DE PLANTAS QUE SE GENERARON EN LOS SISTEMAS DE CULTIVO CON MEDIO SEMISÓLIDO Y LOS SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL

El análisis de costos de materiales, calidad de plantas, tiempo y número de plantas que se generaron en los métodos utilizados se llevo a cabo realizando comparaciones de los resultados estadísticos obtenidos a partir de las tres repeticiones de los experimentos que se llevaron a cabo a través de cultivo *in vitro* convencional; así como los experimentos con los sistemas de inmersión temporal (en el sistema comercial conocido como RITA® se llevaron a cabo 4 experimentos con diferentes parámetros de tiempo y frecuencia de inmersión y el sistema de inmersión temporal alterno se utilizó solo un parámetro de tiempo y frecuencia de inmersión). También se evaluó a partir de qué días se empezó a generar brotes en los explantes que se encontraban en los Sistemas de inmersión temporal; se observó la calidad de las plantas obtenidas en los tres métodos utilizados. La tabla 6 muestra la comparación de los tres sistemas utilizados para las tres especies de *Agave*, dónde se señala el número de brotes obtenidos por explante.

Tabla 6. Comparación de los tres métodos utilizados para la propagación *in vitro* de las especies *A. potatorum*, *A. difformis* y *A. salmiana*. Se señala el número de brotes obtenidos por explante.

Especie	Método de cultivo <i>in vitro</i> conveccional (media ± error estándar)	Tiempo (h) y frecuencia de inmersión (min) en Sistema RITA® (media ± error estándar)	Tiempo (h) y frecuencia de inmersión (min) en Sistema alterno (media ± error estándar)
<i>A. difformis</i>	2.84±0.24	6 h con 10 min 1.20±0.49	24 h con 5 min 0.2 ±0.2
<i>A. salmiana</i>	9.80±0.71	12 h con 5 min 1.20±0.58	24 h con 5 min 0.8±0.49
<i>A. potatorum</i>	4.87±0.42	3 h con 15 min 3.40±0.51	24 con 5 min 1.8±0.37

Para las especies *A. difformis* y *A. salmiana* el método de cultivo *in vitro* convencional resultó ser más eficiente comparándolo con los otros dos sistemas, en el caso de *A. potatorum* los resultados son casi similares en el método de cultivo *in vitro* convencional y en el sistema RITA® con tiempo y frecuencia de inmersión de 3 h con 15 min.

Los brotes obtenidos en todos los métodos utilizados presentaron buena calidad, observándose coloración normal, no hubo hiperhidratación en la mayoría de éstos, presentándose solo en muy pocos brotes.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

En la estimación del costo de reactivos y algunos materiales utilizados para preparar un litro de medio de cultivo en los tres tipos de métodos empleados para propagar diferentes especies del género *Agave in vitro*; resultó que los costos se aproximan. (Tablas 7, 8 y 9) De acuerdo al número de plantas obtenidas en los tres métodos utilizados, el método más eficiente de acuerdo a los parámetros que se establecieron fue el medio semisólido.

En el Sistema de inmersión temporal RITA® se obtuvo una menor cantidad de brotes por explante por lo cual, en este experimento no resulta efectivo utilizar este sistema de acuerdo con los parámetros establecidos.

El Sistema de inmersión temporal alterno, también produjo pocos brotes con los parámetros fijados y comparando este método con el convencional, resulta que el método convencional es más eficiente para la producción de brotes.

En el tiempo de generación de brotes para los Sistemas de inmersión temporal RITA® en la especie *A. potatorum* se pudo observar que la obtención de brotes fue disminuyendo en tiempo al aumentar la frecuencia y el tiempo de inmersión. Donde en el primer experimento se observó brotación a partir del día 27, en el segundo y tercer experimento se observó una disminución en la obtención de brotes hasta llegar a presentarse en el día 12 la aparición de brotes, en el caso de *A. salmiana* en el primer experimento se observó una generación de brotes a partir del día 29, en el tercer experimento fue a partir del día 14. Para *A. difformis* se presentó brotación en el primer experimento a partir del día 12 posteriormente a partir del día 14, en el tercer experimento se observó que hubo brotación hasta el día 37 y en el cuarto experimento se observó brotación en el día 21.

En el sistema de inmersión temporal alterno se obtuvieron brotes a partir del día 20 para *A. potatorum*, para *A. difformis* a partir del día 16 y para *A. salmiana* a partir del día 11.

### 7.6. ANÁLISIS DE COSTOS DE REACTIVOS Y MATERIAL UTILIZADO EN LOS SISTEMAS DE CULTIVO CON MEDIO SEMISÓLIDO Y LOS SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL.

Tabla 7. Costo de reactivos y algunos materiales utilizados en el sistema de cultivo *in vitro* convencional. El costo es un valor aproximado, así como las cantidades utilizadas. Los costos fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH®, así como también fueron comprados en el mercado nacional. El costo esta en dólares (E.U.A. donde 1 dólar estadounidense = 13.36304 pesos mexicanos. Fecha de consulta 09 de julio de 2012); así como en moneda nacional. El costo total se encuentra en moneda nacional. 20% de impuesto al valor agregado

Producto	Costo E.U.A.	Costo Mex	20% I.V.A.	Cantidad	
Cinetina	40.40	539.87	647.84	1 g	
tidiazuron	74.40	994.21	1193.05	25 mg	
Nitrato de amonio		832.00	998.40	2.5 kg	
Nitrato de potasio		922.00	1106.40	2.5 kg	
Yoduro de potasio	38.40	513.14	615.76	100 g	
Cloruro de cobalto	22.10	295.32	354.38	25 g	
Fosfato monobásico de potasio	19.90	265.92	319.10	100 g	
Ácido bórico	40.10	535.86	643.03	500 g	
Molibdato de sodio		927.00	1112.40	100 g	
Sulfato de magnesio	36.50	487.75	585.30	500 g	
Sulfato de manganeso	39.40	526.50	631.80	500 g	
Sulfato de zinc	51.10	682.85	819.42	500 g	
Sulfato de cobre	27.90	372.83	447.39	250 g	
Sulfato ferroso		754.00	904.80	250 g	
E.D.T.A. disódico	39.60	529.18	635.01	100 g	
Glicina	19.10	255.23	306.27	100 g	
Piridoxina HCl	56.30	752.34	902.80	25 g	
Ac. Nicotínico	18.30	244.54	293.44	100 g	
Tiamina HCl	54.40	726.95	872.34	100 g	
Inositol	49.60	662.80	795.36	100 g	
Sacarosa		24.00	24.00	1Kg	
Nitrato de potasio	69.20	924.72	1109.66	500 g	
Nitrato de amonio	36.70	490.42	588.50	500 g	
Sistema de inmersión temporal para tejido vegetal	384.00	5,131.41	6157.69	3 sistemas RITA®	
Temporizador		240.00		1 pieza	
Total					22304.14

Tabla 8. Costo de reactivos y algunos materiales utilizados en el sistema de cultivo *in vitro* con biorreactor RITA®. El costo es un valor aproximado, así como las cantidades utilizadas. Los costos fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH®, así como también fueron comprados en el mercado nacional. El costo esta en dólares (E.U.A. donde 1 dólar estadounidense = 13.36304 pesos mexicanos. Fecha de consulta 09 de julio de 2012); así como en moneda nacional. El costo total se encuentra en moneda nacional. 20% Impuesto al valor agregado.

Producto	Costo E.U.A.	Costo Mex	20% I.V.A.	Cantidad	
6-bencilaminopurina	17.20	229.84	275.80	1 g	
6-y Ydimetilaliaminopurina	71.90	960.80	1152.96	1 g	
Cinetina	40.40	539.87	647.84	1 g	
tidiazuron	74.40	994.21	1193.05	25 mg	
Metatopolina	242.75	3,243.88	3892.65	1 g	
Nitrato de amonio		832.00	998.40	2.5 kg	
Nitrato de potasio		922.00	1106.40	2.5 kg	
Yoduro de potasio	38.40	513.14	615.76	100 g	
Cloruro de cobalto	22.10	295.32	354.38	25 g	
Fosfato monobásico de potasio	19.90	265.92	319.10	100 g	
Ácido bórico	40.10	535.86	643.03	500 g	
Molibdato de sodio		927.00	1112.40	100 g	
Sulfato de magnesio	36.50	487.75	585.30	500 g	
Sulfato de manganeso	39.40	526.50	631.80	500 g	
Sulfato de zinc	51.10	682.85	819.42	500 g	
Sulfato de cobre	27.90	372.83	447.39	250 g	
Sulfato ferroso		754.00	904.80	250 g	
E.D.T.A. disódico	39.60	529.18	635.01	100 g	
Glicina	19.10			100 g	
Piridoxina HCl	56.30	752.34	902.80	25 g	
Ac. Nicotínico	18.30	244.54	293.44	100 g	
Tiamina HCl	54.40	726.95	872.34	100 g	
Inositol	49.60	662.80	795.36	100 g	
Sacarosa		24.00	24.00	1Kg	
Nitrato de potasio	69.20	924.72	1109.66	500 g	
Nitrato de amonio	36.70	490.42	588.50	500 g	
Agar	189.00	2,525.61	3030.73	1 kg	
Frascos 500 mL para medio semisólido		595.00	714.00	85 frascos	
Total					24972.59

Tabla 9. Costo de reactivos y algunos materiales utilizados en el sistema de cultivo *in vitro* con biorreactor alterno. El costo es un valor aproximado, así como las cantidades utilizadas. Los costos fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH®, así como también fueron comprados en el mercado nacional. El costo esta en dólares (E.U.A. donde 1 dólar estadounidense = 13.36304 pesos mexicanos. Fecha de consulta 09 de julio de 2012); así como en moneda nacional. El costo total se encuentra en moneda nacional. 20% impuesto al valor agregado.

Producto	Costo E.U.A.	Costo Mex	20% I.V.A.	Cantidad	
Cinetina	40.40	539.87	647.84	1 g	
tidiazuron	74.40	994.21	1193.05	25 mg	
Nitrato de amonio		832.00	998.40	2.5 kg	
Nitrato de potasio		922.00	1106.40	2.5 kg	
Yoduro de potasio	38.40	513.14	615.76	100 g	
Cloruro de cobalto	22.10	295.32	354.38	25 g	
Fosfato monobásico de potasio	19.90	265.92	319.10	100 g	
Ácido bórico	40.10	535.86	643.03	500 g	
Molibdato de sodio		927.00	1112.40	100 g	
Sulfato de magnesio	36.50	487.75	585.30	500 g	
Sulfato de manganeso	39.40	526.50	631.80	500 g	
Sulfato de zinc	51.10	682.85	819.42	500 g	
Sulfato de cobre	27.90	372.83	447.39	250 g	
Sulfato ferroso		754.00	904.80	250 g	
E.D.T.A. disódico	39.60	529.18	635.01	100 g	
Glicina	19.10	255.23	306.27	100 g	
Piridoxina HCl	56.30	752.34	902.80	25 g	
Ac. Nicotínico	18.30	244.54	293.44	100 g	
Tiamina HCl	54.40	726.95	872.34	100 g	
Inositol	49.60	662.80	795.36	100 g	
Sacarosa		24.00	24.00	1Kg	
Nitrato de potasio	69.20	924.72	1109.66	500 g	
Nitrato de amonio	36.70	490.42	588.50	500 g	
Filtros Millex	16.50	221.29	265.54	6 piezas	
Frascos para reactivos de 500 mL	114.00	1523.40	1828.08	6 piezas	
Manguera de 0.5 mm de diámetro		45.00		3 metros	
Bomba para pecera		300.00		6 piezas	
Llave de tres vías		105.00		6 piezas	
temporizador		480.00		2 piezas	
Total					18,930.07

## 8. DISCUSIONES

- Multiplicación de brotes en medio de cultivo *in vitro* convencional

En este experimento se analizó el número de brotes por explante obtenidos de las tres repeticiones. De acuerdo a los resultados obtenidos para las 17 especies del género *Agave*, todas produjeron brotes; siendo que las especies que mayor número de brotes generaron en las tres repeticiones realizadas (con un promedio mayor a 7 brotes por explante) fueron *A. bracteosa* con un promedio de 7.81 brotes por explante, *A. celsii* con 8.76 brotes por explante, *A. cupreata* produjo 11.02 brotes por explante, *A. funkiana* con 10.74 brotes por explante, *A. obscura* con 8.69 brotes, *A. ornithobroma* con 11.08 brotes, *A. peacockii* produjo 13.37 brotes, *A. salmiana* 9.79 brotes, *A. titanota* con 11.1 brotes y *A. victoria-reginae* con 10.26. Se obtuvo un promedio de brotes por explante para las demás especies de la siguiente manera, *A. difformis* 2.84, *A. karwinskii* 2.84, *A. nizandensis* 5.58, *A. palmeri* 1.29, *A. potatorum* 4.87 y *A. vizcainoensis* 2.51; Domínguez *et al.* (2008 b), señala que para la especie *A. obscura* se produjo un promedio de 11 brotes, mientras que en los resultados obtenidos en las tres repeticiones realizadas, la especie obtuvo un promedio de 8.69 brotes, lo cual muestra un promedio de brotación un poco menor que el mencionado por éste autor. Para las especies *A. difformis* se obtuvo en el promedio 2.84 brotes por explante para las tres repeticiones realizadas y *A. karwinskii* obtuvo el mismo promedio; Domínguez *et al.* (2008 b), menciona que para *A. difformis* se tuvo un promedio de brotación de 8.5 y para *A. karwinskii* fue de 6.1 utilizando 0.2 mg L<sup>-1</sup> TDZ y 1.0 mg L<sup>-1</sup> BA respectivamente.

Todas las especies tuvieron un porcentaje de brotación superior al 50%, siendo que las especies que presentaron un porcentaje igual o mayor al 80% en las tres repeticiones fueron *A. bracteosa*, *A. chiapensis*, *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. funkiana*, *A. karwinskii*, *A. nizandensis*, *A. ornithobroma*, *A. peacockii*, *A. potatorum*, *A. salmiana*, *A. titanota*, *A. victoria-reginae* y *A. vizcainoensis*.

- Seleccionar tres especies de *Agave* de los sistemas de propagación *in vitro* convencionales, y propagarlas bajo un sistema comercial de inmersión temporal.

Se seleccionaron las especies *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis* para ser propagadas en Sistemas de inmersión temporal RITA®.

Estos experimentos consistieron en evaluar diferentes tiempos de inmersión y de frecuencia de inmersión de los explantes en el medio de cultivo líquido, con las tres especies del género *Agave* que se mencionan anteriormente. Se evaluó el número de brotes generados por explante. El primer tiempo de inmersión utilizado fue de 5 minutos con una frecuencia de inmersión de 12 horas; posteriormente en otro experimento se utilizó un tiempo de inmersión de 10 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 6 horas, después en otro experimento se utilizó un tiempo de inmersión de 15 minutos y frecuencia de inmersión de cada 3 hora, finalmente se utilizó un tiempo de 20 minutos y una frecuencia de cada 8 horas. Para el primer experimento con un tiempo de inmersión de 5 minutos y una frecuencia de inmersión de cada 12 horas, se pudo observar que para la especie *A. potatorum* hay generación de brote en explante a partir de la 5ª semana, para *A. salmiana* se presentó la brotación a partir de la 5ª semana y en el caso de *A. difformis* fue en la 4ª semana. En el segundo experimento donde las condiciones de tiempo y frecuencia de inmersión fueron de 10 minutos cada 6 horas, se pudo observar que para la especie *A. potatorum* la brotación comenzó a partir de la 4ª semana, en el caso de *A. salmiana* no hubo brotación y para *A. difformis* se presentó a partir de la 3ª semana. En el tercer experimento con condiciones de frecuencia de inmersión de cada 3 horas con un tiempo de inmersión de 15 minutos, se observó que en *A. potatorum* hubo generación de brotes a partir de la 3ª semana, en *A. salmiana* se presentó en la 3ª semana y para *A. difformis* fue en la 8ª semana de tratamiento. En el último experimento con tiempo y frecuencia de inmersión de 20 minutos cada 8 horas no se generó brotes para las especies *A. potatorum* y *A. salmiana*, siendo que para *A. difformis* hubo generación de un brote en la 4ª semana de haber sido transferidos los meristemos basales a biorreactor RITA®. Para el caso de *A. potatorum* se pudo observar que conforme se duplicaron y posteriormente se triplicaron los tiempos de inmersión y de frecuencia de inmersión, la generación de brotes se produjo de manera más rápida, siendo que con los tiempos de inmersión de 5 minutos y la frecuencia de inmersión de cada 12 horas la brotación se presentó aproximadamente a los 27 días de haber sido

colocados los explantes en el biorreactor RITA® comparando el experimento que se llevo a cabo con tiempo y frecuencia de inmersión de 15 minutos cada 3 horas la brotación se presentó a los 16 días. En el caso de *A. salmiana* para el tiempo de inmersión de 5 minutos con frecuencia de inmersión de 12 horas, se presentó proliferación a partir de los 29 días, siendo que con el tiempo y frecuencias de inmersión de 15 minutos cada 3 horas respectivamente la proliferación fue a los 14 días. Con tiempo y frecuencia de inmersión de 5 minutos cada 12 horas, la especie *A. difformis* empezó a producir brotación a partir de los 21 días, siendo que con un tiempo de inmersión de 10 minutos y frecuencia de inmersión de cada 6 horas, la brotación comenzó a partir de los 14 días, para un tiempo y frecuencia de inmersión de 15 minutos cada 3 horas se obtuvo brotes a partir del día 45. De acuerdo a éstos resultados obtenidos se pudo observar que para estos tiempos y frecuencias de inmersión establecidos hubo proliferación de los explantes en menor tiempo conforme se aumentó el tiempo y la frecuencia de inmersión, en el caso de *A. difformis* se presentó cuando los tiempos y frecuencias de inmersión se duplicaron y para las otras dos especies cuando los tiempos y frecuencias de inmersión se triplicaron. Berthouly y Etienne (2005) señalan que en los sistemas de cultivo de tejidos con inmersión temporal, el tiempo de inmersión temporal es muy importante puesto que regula la absorción de nutrientes y la expresión de hiperhidricidad. Los tiempos de inmersión utilizados para trabajos diferentes varían considerablemente, esto es probablemente debido a la gran variedad de especies y procesos de micropropagación y los sistemas de inmersión temporal utilizados. Largos tiempos de inmersión (1 h cada 6 h) llegaron a ser eficientes para la tuberización de patata, mientras tiempos cortos de inmersión (1 min cada 12 h) estimularon la producción de embriones somáticos de café (Etienne et al. 1997 a,b). Del mismo modo inmersiones muy frecuentes (30 seg cada 30 seg) pueden llegar a ser altamente eficientes para la propagación de brotes de vid (Harris y Mason, 1983). Berthouly et al. (1995), muestran con microesquejes de café que el tiempo de inmersión afecta substancialmente la tasa de multiplicación, además el tiempo de inmersión óptimo varía dependiendo de las especies de café utilizadas. En el último experimento establecido para las tres especies con un tiempo y frecuencia de inmersión de 20 minutos cada 8 horas tanto para *A. potatorum* como para *A. salmiana* no hubo brotación, para *A. difformis* se presentó a partir de los 21 días sin embargo se presentó hiperhidratación en la mayoría de los explantes de esta especie, según Krueger et al. (1991) señala que las frecuencias de inmersión para la proliferación de serviceberry, se mostró hiperhidricidad

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

con inmersiones de 5 minutos cada 30 minutos pero no se observaron con inmersiones de 5 minutos cada 60 minutos, por otro lado la primera combinación fue mejor para el número de brotes obtenidos; para el caso de la proliferación de *A. salmiana*, *A. potatorum* no se observó hiperhidricidad en los tiempos y frecuencias establecidos, en el caso de *A. difformis* solo se presentó hiperhidricidad al haber un aumento en el tiempo de inmersión; se pudo observar en el caso de *A. salmiana* que aunque con los aumentos de frecuencia y tiempo de inmersión produjeron una reducción en el tiempo de proliferación, la brotación por explante fue menor, siendo que los tiempos y frecuencias mejores para esta especie en el aspecto de producción de brotes fueron con 5 minutos cada 12 horas. En el caso de *A. difformis* el mejor tiempo y frecuencia de inmersión tanto para producción de brotes por explante como para el tiempo en que comienzan a producirse fue con 10 minutos de inmersión cada 6 horas, mientras que *A. potatorum* resultó favorable el incremento de los tiempos y frecuencias de inmersión hasta 15 minutos cada 3 horas ya que tanto se produjo una mayor cantidad de brotes por explante como se redujo el tiempo de proliferación. Porque un tiempo mayor de inmersión resultó ser desfavorable en el aspecto de producción de brotes.

De acuerdo a los resultados obtenidos comparando el método de cultivo *in vitro* convencional y el método utilizando los biorreactores RITA<sup>®</sup> (cuadro 1 y 2), el promedio de brotes por explante obtenido para los dos tratamientos realizados con el sistema RITA<sup>®</sup> a diferentes tiempos de inmersión y de frecuencia produjo un menor número de brotes en comparación con el método de cultivo *in vitro* convencional; resultados obtenidos por Salazar y Hoyos (2007), muestran que con una densidad de 5 brotes para un tratamiento con la especie *Dioscorea alata L.* no se obtuvo un mayor número de brotes comparado con el método *in vitro* convencional, resultado similar se observó para las tres especies de *Agave* que se seleccionaron en este experimento con biorreactor RITA<sup>®</sup>.

Berthouly y Etienne (2005), mencionan que en los sistemas de cultivo con inmersión temporal del tejido, el tiempo de inmersión es muy importante puesto que regula la absorción de nutrientes y la expresión de hiperhidricidad, de acuerdo a los diferentes tiempos de inmersión así como frecuencia de inmersión que se llevaron a cabo para las especies *A. difformis*, *A. potatorum* y *A. salmiana*. Se pudo observar que para *A. potatorum* con un aumento en tiempo de inmersión y frecuencia de inmersión 3 horas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cada 15 minutos, se obtuvo un promedio de 3.4 brotes por explante siendo que en un tiempo de inmersión de 5 minutos cada 12 horas se tuvo un promedio de 1.0 brote por explante. Para el caso de *A. salmiana* no se generó un aumento en la obtención de brotes al incrementarse el tiempo de inmersión a 15 minutos y la frecuencia de inmersión cada 3 horas, se obtuvo un promedio de brotación de 0.2 siendo que para las condiciones de inmersión de cada 5 minutos y frecuencia de inmersión de cada 12 horas se obtuvo un promedio de 1.2 brotes por explante. En *A. difformis* se observó que en una frecuencia de inmersión de cada 3 horas con un tiempo de inmersión de cada 15 minutos el promedio de brotación fue de 0.2, y con un tiempo de inmersión de cada 5 minutos por cada 12 horas se obtuvo un promedio de brotación de 1.0.

Para la especie *A. potatorum* se presentó a partir del tiempo y frecuencia de inmersión de 10 minutos cada 6 horas un incremento en la obtención de brotes, siendo que para la exposición a 20 minutos cada 8 horas hubo un deceso en la obtención de brotes. En el caso de *A. salmiana* y *A. difformis* no se presentó una tendencia marcada para la obtención de brotes en alguno de los tiempos establecidos. Existe una relación inversa entre el aumento de los ciclos y la duración de inmersión con el número de brotes obtenidos para estas tres especies seleccionadas.

- Construir un Sistema alternativo de inmersión temporal y probar su eficiencia con las tres especies seleccionadas.

Se construyó un sistema de inmersión temporal alterno, éste sistema consistió en la utilización de dos frascos unidos mediante una manguera, en donde una de los frascos contenía el medio de cultivo líquido y el otro los explantes. De acuerdo a los resultados obtenidos con las especies seleccionadas *A. potatorum* obtuvo un promedio de 1.8 brotes por explante, *A. salmiana* 0.8 brotes por explante y *A. difformis* 0.2 brotes por explante, estos resultados se obtuvieron con un tiempo y frecuencia de inmersión de 5 minutos cada 24 horas, comparando el número de brotes obtenidos en el sistema de inmersión temporal alterno con el experimento realizado con los sistemas de inmersión temporal comerciales (RITA®) a 5 minutos de inmersión cada 12 horas se pudo observar que para *A. potatorum* el sistema de inmersión temporal alterno resultó ser un poco más efectivo que el comercial ya que el número de brotes por explante obtenidos fue aproximadamente el doble, en el caso de *A. salmiana* el sistema comercial fue más efectivo y para *A. difformis* también. Escalona, et al. (1999) señala que con el sistema de inmersión

temporal de dos contenedores que se construyó para la propagación de piña a gran escala, se permitió un suministro constante de nutrientes y aireación de las plantas sin el uso de tecnología sofisticada; en el sistema de inmersión temporal alterno utilizado en la propagación de especies del género *Agave* se obtuvo brotes, lo cual nos indica que el sistema es efectivo para la proliferación de brotes en las especies trabajadas. Aunque el número de brotes generados no fue mayor para dos de las especies de *Agave* comparando éste sistema con el sistema RITA<sup>®</sup>, con el tiempo y frecuencia de inmersión establecidos, probablemente aumentado éstos parámetros se puede obtener un mejor porcentaje de brotación.

La calidad de los brotes que se obtuvieron a partir de la utilización de medio de cultivo semisólido así como con los sistemas de inmersión temporal fue buena, autores como Cabasson *et al.* 1997 mencionan que la inmersión temporal ha tenido un efecto altamente positivo en el desarrollo de embriones somáticos de *Citrus* conduciendo al desarrollo de cotiledones y protodermis así como en el trabajo realizado por Domínguez *et al.* (2008 b) se propagaron *in vitro* de manera eficiente varias especies de *Agave* utilizando medios de cultivo semisólidos.

- Análisis de los costos de los Sistemas de inmersión temporal y convencional.

Los costos de los materiales utilizados para los sistemas de inmersión temporal así como para el sistema de cultivo *in vitro* convencional difieren, siendo que los sistemas de inmersión temporal utilizados en este trabajo, resultaron ser económicamente más efectivos con las especies que se trabajaron y los reguladores de crecimiento vegetal, en comparación con los sistemas de cultivo *in vitro* convencional, con las especies trabajadas y los reguladores de crecimiento vegetal utilizados. La calidad de los brotes para los sistemas de inmersión temporal así como para el medio de cultivo *in vitro* convencional fue buena para ambos sistemas, los brotes obtenidos presentaron un tamaño adecuado, la vitrificación no se presentó de manera regular, solamente fue en muy pocos explantes.

## **9. CONCLUSIONES**

Se logró propagar las especies *Agave bracteosa*, *A. celsii*, *A. chiapensis*, *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. funkiana*, *A. karwinskii*, *A. nizandensis*, *A. obscura*, *A. ornithobroma*, *A. palmeri*, *A. peacockii*, *A. potatorum*, *A. salmiana*, *A. titanota*, *A. victoria-reginae*, *A. vizcainoensis* a través de método *in vitro* convencional. Las especies *A. difformis*, *A. salmiana* y *A. potatorum* se propagaron a través de un Sistema de Inmersión Temporal comercial conocido como RITA®. El tiempo de inmersión de 15 minutos con una frecuencia de inmersión de cada 3 horas fue más efectivo para la especie *A. potatorum* con un promedio de 3.4 brotes por explante. El tiempo de inmersión de cada 5 minutos con una frecuencia de inmersión de cada 12 horas fue efectivo para las especies *A. salmiana* y *A. difformis*. El método de cultivo *in vitro* convencional resultó ser más eficiente para la proliferación de brotes de las especies *A. potatorum*, *A. salmiana* y *A. difformis* a partir de meristemos basales en comparación con el método de cultivo utilizando biorreactor RITA® con tiempos de inmersión de 5, 10,15 y 20 minutos así como con frecuencias de inmersión de 12, 6, 3 7 8 horas respectivamente. El Sistema de Inmersión Temporal Alterno resultó ser eficiente para la generación de brotes en las tres especies de *Agave* utilizadas. Se obtuvieron plantas de buena calidad en un lapso menor a 50 días en los sistemas de cultivo *in vitro* utilizados. En este trabajo se demostró que cada especie del género *Agave*, responde de diferente manera a los tiempos y frecuencias de inmersión a los que se expongan los explantes, esto con la finalidad para la producción de brotes así como para el tiempo en el que tarda el explante en generarlos. El método convencional resultó ser más eficiente en cuanto a la producción de brotes que el Sistema RITA® y el Sistema de inmersión temporal alterno con los tiempos y frecuencias de inmersión establecidas para este trabajo.

## 10. BIBLIOGRAFIA

- Abdelnour, A. y Vicent, J. 1994. Conceptos Básicos del Cultivo de Tejidos Vegetales. edit. CATIE. Costa Rica. 38 pp.
- Afreen, F. 2006. Temporary Immersion Biorreactor. *Engineering considerations and applications in plant micropropagation*. Plan Tissue Culture Engineering. Vol. 6. Edit. Springer Netherlands. ISBN: 978-1-4020-3694-1. Netherlands. 187-201 p.
- Aitken-Christie, J., Kozai, T. y Takayama, S. 1995. Automation in plant tissue culture. General introduction and overview. In: Aitken-Christie J, Kozai T & Smith MAL (eds) *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture* (pp. 1-18). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Alister, B., Finnie, J., Watt, M. y Blaceway, F. Use of the Temporary Immersion Biorreactor System (RITA®) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forest (SA). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Edit. Springer. E.U.A. 425-442 p. eISBN: 978-1-4020-3200-4 printed in Netherlands
- Alvard, D., Cote, F. y Teisson, C. 1993. Comparison of methods of liquid medium cultura for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32:55-60. ISSN: 0167-6857
- Andrijany, V., Indrayanto, H., Soehono, L. 1999. Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt ions on sapogenin steroids content in callus cultures of *Agave amanuensis*. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 55:103-108
- Akula, A., Becker, D. y Bateson, M. 2000. High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clone, 'TRI-2025', by temporary immersion. *Plant Cell Rep.* 19: 1140-1145
- Aragón, C., Escalona, M., Capote, I., Cejas, I. Rodríguez, R., Sandoval, J., Roels, S., Debergh, P. y González, J. 2006. Aspectos metabólicos del crecimiento y desarrollo de las plántulas de plátano (cemsá ¾) micropropagadas en

Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT). Cultivos Tropicales. ISSN 02585936.  
Vol. 27 , número 1, 39-44 pp.

Berthouly, M. y Etienne, H. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation. Edit. Springer. E.U.A. 165-195 p. eISBN: 978-1-4020-3200-4 printed in Netherlands

Berthouly, M., Dufour, M., Alvard, D., Carasco, C., Alemano, L. y Teisson, C. (1995). Coffee micropropagation in a liquied medium using the temporary immersion technique. In: ASIC Publishers 16<sup>th</sup> International Scientifical Colloquium on Coffee, Kyoto, Japon (pp. 514-519). Switzerland

Binh LT, Muoi LT, Oanh HTK, Thang TD & Phong DT .1990. Rapid propagation of agave by in vitro tissue culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 23: 67–70

Cabasson, C., Alvard, D., Dambier, D., Ollitrault, P. y Teisson, C. (1997). Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 50:33-37

Castro-Concha L, Loyola-Vargas VM, Chan JL y Robert ML. 1990. Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of Agave tequilana Weber propagated in vitro. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 22: 147–151

Cazzulino D, Pederson H & Chin CK (1991) Bioreactors and image analysis for scale-up and plant propagation. In: Vasil IK (ed) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants (pp.147–177). Academic Press, San Diego, CA

Chatterjee, C. Corell, M. Weathers, P. Wyslouzil, B. y Wacers, D. 1997. Simplified acoustic window mist bioreactor. Biotechnol. Tech. 11: 159–158

Colunga, P., Coello, J., Espejo, L. y Fuente, L. 1993. Agave studies in Yucatan, Mexico.II. Nutritional value of the inflorescence peduncle and incipient domestication. Economic Botany. . Springer New York. ISSN: 0013-0001 Vol 47 Num 3 328-334 p.

Colunga, P., Larqué, A., Eguiarte, L. y Zizumbo, D. 2007. En lo Ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. CICY-CONACYT-CONABIO-INE. México. 452 pp.

- CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre). 15 mayo 2011. <http://www.cites.org/esp/app/appendices.shtml>
- Dahlgren, R. T. M, H. T. Clifford and P. F. Yeo. 1985. The families of the monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag. Berlin. 520 p
- Das, T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell, tissue and Organ Culture. 31: 253-255
- Debergh, P. 1982. Physical properties of culture media. En: Fujiwara A. (ed). Plant tissue culture. Tokio. 135-136
- Debergh, P. and Maene, L. 1984. Pathological and physiological problems related to the *in vitro* culture of plants. Parasitica 40: 69-75.
- Domínguez, M., González, M., Rosales, C., Quiñones, C. Delgadillo, S., Mireles, S. y Pérez, E. 2008 (a). El Cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. Investigación y Ciencia. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. ISSN 1665-4412. Número 41, 53-62pp.
- Domínguez, M., Alpuche, Á., Vasco, N. y Pérez, E. 2008 (b). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de *Agaves* mexicanos. Revista Fitotecnica Mexicana. Vol 31 (4): 317-322. ISSN 0187-7380. 317-322 pp
- Eguiarte, L. E., Souza, V y Silva-Montellano, A. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: Filogenia, Biología reproductiva y genética de poblaciones. Bol. Soc. Bot. Mex. 66: 131-150.
- Eguiarte, L.E. y Souza, V. 2007. Historia natural del *Agave* y sus parientes: Evolución y Ecología. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros *agaves*. Edit. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México. 395pp. ISBN: 978-968-6532-18-0
- Enríquez del Valle, J., Carrillo, G. Rodríguez de la O, J. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. Revista Fitotecnica Mexicana. 28:175-178

- Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, González, J. Desjardins, Y. y Borroto, C. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 18:743-748
- Escalona, M., Samson, G., Borroto, C. y Desjardins, Y. 2003. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 39:651-656. ISSN: 1054-5476
- Etienne, H., Bertrand, B., Anthony, F., Côte, F. y Berthouly, M. (1997 a) L'embryogenèse somatique: un outil pour l'amélioration génétique du caféier. In: ASIC Publishers 17<sup>th</sup> International Scientific Colloquium on Coffee, Nairobi, Kenya (pp. 457-465). Switzerland.
- Etienne, H., Lartaud, M., Michaux-Ferrière, N., Carron, MP., Berthouly, M. y Teisson, C. 1997 (b). Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll.Arg) using the temporary immersion techniques. *In Vitro Cell. Biol.* 33: 81-87
- Frydrych, D. 1982. Induction of *in vitro* de bourgeons adventifs a partir du sisal. Premiers resultants. *Cot Fib Trop* 37:295–304
- García, A. 2007. Los Agaves de México. *Rev. Ciencias. Jardín Botánico Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.*14-23p. ISSN 0187-637
- García-Mendoza, A. Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México. In: Linares, E.; Dávila, P.; Chiang, F.; Bye, R.; Elias, T., eds. *Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques.* México, D.F.: UNAM; 1995:51–75.
- Gentry, H. 1982. *Agaves of Continental North America.* The University of Arizona Press. E.U.A. 670 pp.
- Granados, D. 1993. Los Agaves en México. *Universidad Autónoma de Chapingo.* México. (1):252
- Green, K. D., and Thomas, N. H. (1996) An integrated "Root tube" bioreactor/separator for transformed root cultures, *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81, 453-457.

- Groenewald EG, Wessels DCJ & Koeleman A. 1977. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an Agave species (Agavaceae). Z. Pflanzenphysiol. 81: 369–373
- Hanhineva, K., Kokko, H. y Kärenlampi, S. 2005. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria X ananassa*) cultivars in Temporary Immersion Bioreactor System. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 41:826–831. ISSN: 1054-5476
- Harris, R. y Mason, E. (1983). Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. Can. J. Plant Sci. 63:311-316
- Hazra, K., Das, S., Das, K. 2002. Sisal plant regeneration via organogénesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 70:235-240
- Jiménez, E. 2005. Mass propagation of tropical crops in Temporary Immersion Systems. Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Edit. Springer. EUA. 197-211 p. ISBN: 978-1-4020-3200-4 printed in Netherlands
- Krueger, S., Robacker, C. y Simonton, W. (1991). Culture of *Amelanchier x grandiflora* in a programmable micropropagation apparatus. Plant Cell, Tiss Org. Cult. 27:219-226
- Lachenmeier, D., Sohnius, E., Attig R. y Lopez, M. 2006. Quantification of selected volatile constituents and anions in Mexican Agave spirits (tequila, mezcal, sotol, bacanora). J Agric Food Chem 54(11):3911–3915
- Luczkiewicz, M., and Kokotkiewicz, A. 2005. Co-cultures of shoots and hairy roots of *Genista tinctoria* L. for synthesis and biotransformation of large amounts of phytoestrogens, Plant Science 169, 862-871
- Madrigal-Lugo R, Pineda-Estrada F & Rodríguez de la O JL (1989) Agave. In: Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR & Bajaj YPS (eds.) Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 5. Ornamental Species, Chapter 9 (pp 206–227). McGraw Hill Publ. Co., New York.
- Maiti, R. 1995. Fibras vegetales en el mundo: aspectos botánicos: calidad y unidad. Trillas: México. (1):300
- Maldonado-Cantú, C. 1996. Miel de Agave, alimento saludable. El surco Edición Mexicana. Año (101):8.

- Martínez, A., Ortega, M., Chávez, V. y Bye, R. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 135–142
- Merchuk, JC. 1990. Why use air-lift bioreactors? *Trends Biotechnol.* 8: 66–71
- Nikam, D. 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, and Organ Culture.* 51: 225-228.
- Nikam, D., Bansude, G. y Aneesh, K. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). *Plant Cell Rep* 22:188–194
- Norma Oficial Mexicana. 15 mayo 2011.  
[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle\\_popup.php?codigo=5173091](http://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5173091)
- Olmos, S., Luciani, G. y Galdeano, E. 2010. Micropropagación. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II.* Edit. INTA. Argentina. 648pp.
- Paek, K. Y.; Hahn, E. J. and On, S. H. 2001. Application of bioreactors for large-scale micropropagation system of plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* 37: 149-157
- Pérez, E., Ramírez, R., Gordon, H. y Ochoa, N. 1999. *Introducción al cultivo de tejidos vegetales.* Edit. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. 179pp
- Preil, W. 1991. Application of bioreactors in plant propagation. In: Debergh PC & Zimmerman RH (eds) *Micropropagation: Technology and Application* (pp. 425–455). Kluwer Acad. Publ., Dordrecht
- Phillips, S., Wentworth, P. 2000. *A Natural History of the Sonora Desert.* Edit. Arizona-Sonora desert Museum Press. Canada. 625 pp. ISBN: 0 520 21980 5.
- Portillo, L., Santacruz, F., Gutiérrez, A. y Rodríguez, B. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 43:569–575
- Powers, D y Backhaus, R. 1989. In vitro propagation in *Agave arizonica* Gentry and Weber. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 16:57–60.

- Praznik W, Cieslik E, y Lopez M. 2002. Composition of nutritional components in Agave tequila Weber var. Azul. Abstracts 9th Seminar in Insulin, Budapest, Hungary, 18-19
- Preil, W. 1991. Application of bioreactors in plant propagation. In: Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H., (Eds.) Micropropagation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht , The Netherlands; pp. 425-445.
- Ramírez, R., Borodanenko, A., Pérez, L., Salas, M., Nuñez, H. y Ochoa, N. 2008. In vitro propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Issn: 0167-6857. Vol. 94 número 2, 201-206 pp.
- Rivas, M. 1996. Cactáceas y suculentas del Jardín Botánico Lankester. Edit. EUNED. Costa Rica. 48p.
- Robert, M; Herrera, J., Contaras, F. y Scorer, N. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (henequen). Plant Cell Tissue Organ Cult 8:37–48
- Robert, M., Herrera, J., Castillo, E., Ojeda, G. y Herrera, A. 2006. An Efficient Method for the Micropropagation of Agave Species. Methods in Molecular Biology Plant Cell Culture Protocols. 2a edición. edit. Humana Press. E.U.A. 165-178p. eISBN: 1-59259-959-1
- Roca, W. y Mroginski, L. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. edit. CIAT. Colombia. 953pp.
- Rocha, M. S., V. Good-Avila, F. Molina-Freaner, H. Arita, A. Castillo, A. García-Mendoza, A. Silva-Montellano, B. S. Gaut, V. Souza and L. E. Eguiarte. 2006. Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis in the genus *Agave*. Aliso 22: 327-342 (Proceedings of the Third International Conference on the Comparative Biology of Monocotyledons and Fourth International Symposium on Grass Systematics and Evolution)
- Rodríguez-Garay B, Gutiérrez-Mora A y Santacruz-Ruvalcaba F. 1996. Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales en agaváceas para zonas áridas. In: Izquierdo J & Palomino G (eds) Técnicas Convencionales y Biotecnológicas

para la Propagación de Plantas de Zonas Áridas (pp 57–86). FAO Regional Office for the Latin American and Caribbean Region, Santiago, Chile

Rojas, S., García, J. y Alarcón, M. 2004. Propagación Asexual de Plantas. Conceptos Básicos y Experiencias con Especies Amazónicas. Edit. Corpoica, MADR y Pronatta. ISBN 958-8210-57-7. Colombia. 55 pp.

Santacruz, F., Gutiérrez, H., Rodríguez, B. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 163–167

Scragg, AH. 1992. Large-scale plant cell culture: methods, applications and products. Curr. Opin. Biotech. 3: 105–109

Silos-Espino, H. *et al.* Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* ‘Gentry’. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 82:355-359

Styer, DJ. 1985. Bioreactor technology for plant propagation. In: Henke RR, Hughes KW, Constantin MJ & Hollaender A (eds) Tissue Culture of Forestry and Agriculture (pp. 117–130). Plenum Press, New York

Takayama, S. 1991. Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture techniques. In: Bajaj YPS (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry: High-Tech and Micropropagation, Vol. 17 (pp. 1–46). Springer-Verlag, Berlin

Takayama S y Akita M. 1998. Bioreactor techniques for largescale culture of plant propagules. Adv. Hort. Sci. 12: 93–100

Tejavathi, D. *et al.* 2007. Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 43:423-428

Thiede, J. 2001. Agavaceae. In U. Eggli (ed.). Illustrated handbook of Succulent plants: Monocotyledons. Springer–Verglag, Berlin. 5-102p.

Valenzuela, A. 2003. El Agave tequilero: Cultivo e Industria de México. 3ª edición. edit. Mundi Prensa México, S.A. de C.V. México. 215 pp

Valenzuela-Sánchez, K. *et al.* 2006. Plant Regeneration of *Agave tequilana* by Indirect Organogenesis. In Vitro Cell. Dev. Biol. –Plant. 42:423-428

Vázquez, F. y Loyola, V. 2003. In vitro Plant Cell Culture as the basis for the development of a Research Institute in Mexico: Centro de Investigación Científica de Yucatán. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 39:250-258

Ziv, M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. Hortic. Rev. 24: 1–30

Ziv, M. 2005. Simple biorreactors for mass propagation of plants. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 81:277-285.

Zizumbo, D., González, F., Olay, A., Platas, R., Cuevas, M., Almendros, L. y Colunga, P. 2009. Archaeological Evidence of the Cultural Importance of Agave spp. in Pre-Hispanic Colima, Mexico. Economic Botany. Springer New York. ISSN: 0013-0001 Vol. 63 Num. 3 288-302 p

