



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A. C.**

**DISEÑO DE UN PROTOCOLO PARA LA PROPAGACIÓN
IN VITRO DE *Agave parviflora* Torr. MEDIANTE
ORGANOGENESIS DIRECTA**

Por:

Rosa Antonina Kancab Uc

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Rosa Antonina Kancab Uc, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dr. Martín Esqueda Valle
Director de Tesis



Dr. Martín Tiznado Hernández
Asesor



Dr. Manuel L. Robert
Asesor



M. en C. Alfonso Sánchez Villegas
Asesor

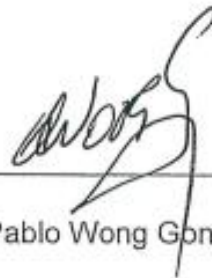


M. en C. Aldo H. Gutiérrez Saldaña
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de maestría y así mismo la realización de este proyecto.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. por prestar sus instalaciones y las facilidades para la realización de esta tesis.

Al Dr. Martín Esqueda Valle por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por la confianza depositada en mí.

A los integrantes de mi comité de tesis por su tiempo, paciencia e invaluable conocimiento compartido con su servidora, al Dr. Martín Tiznado por su disposición y atenciones como investigador y profesor en el aula de clases. Al M. en C. Alfonso Sánchez por sus consejos y observaciones en la redacción de la tesis. Al M. en C. Aldo Gutiérrez por su apoyo técnico en el desarrollo del proyecto.

Al M. en C. Andrés Quijano por ser parte fundamental en este logro académico, por todo el conocimiento compartido y los muchos consejos en momentos difíciles, por estar siempre al pie del cañón cuando fue necesario y por su invaluable amistad, este logro es suyo también, muchísimas gracias!!

A la M. en C. Gabriela Millán por compartirme su experiencia en la micropropagación y sobre todo por su amistad.

A la Biol. Georgina Vargas por su apoyo técnico en el cultivo de tejido en experimentos preliminares.

Al M. en C. Damián López Peña por en ayudarme en mis estadísticos y por su disponibilidad en ayudar en todo momento. Gracias.

Al M. en C. Isidro Méndez Romero por su apoyo en el diseño en las presentaciones, por su ayuda incondicional y sobre todo por su invaluable amistad.

Al personal de CIAD por las facilidades prestadas durante esta etapa académica: profesores, administrativos y personal de mantenimiento.

A mis amigas de la generación Aby Vega, Isabel y Andrés Pacheco por hacer de esta etapa de vida la mejor de principio a fin.

A mis amigos de Eliezer Sánchez, Moisés Ignacio, Daniela Téllez e Idaly Morales por brindarme su amistad y su compañerismo durante mi estancia en la maestría en Hermosillo.

A mis amigos de toda la vida Edwin, Gamaliel, Rubí y Rosita, por las vivencias juntos, por esos días buenos y malos que nos hicieron más fuertes y prósperos, porque hoy somos el resultado de todos ellos.

DEDICATORIA

A JEHOVA Dios, porque con Él todo y sin Él nada.

A mis padres Rodi Enrique Kancab y Basilia Uc por su amor, educación y valores, inculcados desde mi niñez hasta ahora. Por su comprensión y apoyo incondicional.

A mis hermanos Flor, Raúl, Laura, Rómulo y Rodi por hacer de mi vida una aventura cada día compartido con cada uno de ellos, sin ustedes nada sería lo que es.

A mi familia política Arturo, Jorge y Zoila por sus consejos y apoyo, por hacer de su hogar un lugar comfortable para reposar. Por ser parte de mi vida.

A mi segunda madre Rosario Kancab por estar siempre al pendiente de mí, por su amor incondicional y sus consejos en tiempos de calamidad.

A mi hermanita Rubalí Kú por ser mi cómplice, amiga y confidente porque tú le pones color a mis travesuras y haces de ellos momentos inolvidables. Gracias por ser como eres!.

Al amor de mi vida Moisés Pérez por ser mi compañero, mi amigo y confidente por acompañarme en este proyecto de vida, por comprenderme, animarme y sobre todo por esperarme, gracias por existir.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE CUADROS	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Importancia del Género <i>Agave</i>	3
II.2 Usos Tradicionales del <i>Agave</i>	4
II.2.1 Bebidas Alcohólicas	4
II.2.2 Bioactivos	5
II.2.3 Ornamental	6
II.3 Taxonomía y Fisiología del <i>Agave</i>	6
II.4 Distribución	8
II.5 Especies y Subespecies Endémicas de Sonora	9
II.6 Especie <i>Agave parviflora</i> Torr.....	9
II.6.1 Descripción Botánica y Fisiológica.....	10
II.6.2 Distribución	11
II.6.3 Propagación	12
II.6.4 Situación Actual de la Especie	13
II.7 El Cultivo de <i>Agave parviflora</i> Torr. y sus Limitaciones.....	14
II.8 Cultivo de Tejido <i>in vitro</i> de <i>Agave</i>	15
II.9 Métodos más Utilizados	16
II.9.1 Organogénesis Directa	17
II.9.2 Organogénesis Indirecta	17
II.9.3 Embriogénesis Somática	18

CONTENIDO (Continuación)

	Página
II.10 Uso de Fitoreguladores en el Cultivo <i>in vitro</i>	19
II.11 Establecimiento de Protocolos de Micropropagación <i>in vitro</i> de <i>Agave</i>	20
II.11.1 Selección de la Planta Madre	20
II.11.2 Selección del Explante	20
II.11.3 Extracción del Tejido Meristemático	21
II.11.4 Desinfección del Explante.....	21
II.11.5 Inducción	22
II.11.6 Multiplicación	22
II.11.7 Subcultivo.....	22
II.11.8 Establecimiento <i>ex vitro</i>	23
III. JUSTIFICACIÓN	24
IV. HIPÓTESIS	25
V. OBJETIVOS.....	26
V.1 Objetivo General.....	26
V.2 Objetivos Específicos	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
VI.1 Recolección de Material Vegetativo.....	27
VI.2 Preparación del Material Vegetativo	28
VI.3 Inducción	28
VI.4 Incubación.....	29
VI.5 Factor de Multiplicación.....	29
VI.6 Multiplicación.....	30
VI.7 Enraizamiento	31
VI.8 Establecimiento <i>ex vitro</i>	31
VI.8.1 Aclimatación	31

CONTENIDO (Continuación)

	Página
VI.9 Análisis Estadístico.....	32
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
VII.1 Inducción	33
VII.2 Factor de Multiplicación.....	36
VII.3 Multiplicación.....	37
VII.4 Enraizamiento	39
VII.6 Aclimatación.....	42
VII.7 Recomendaciones	44
VIII. CONCLUSIONES.....	45
REFERENCIAS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Descripción grafica de las características botánicas de <i>A. parviflora</i> Torr. (Arizona Rare Plant Committee, 2000)	10
2	Tipos de inflorescencias y propagación convencional del género <i>Agave</i> . (CONABIO, 2006)	13
3	Área de colecta del material vegetal.	27
4	Separación de botes según su crecimiento en medio MS.	29
5	Porcentaje de contaminación de plantas inducidas.....	34
6	Contaminación por bacteria en los explantes inducidos.....	34
7	Respuesta cualitativa por semana de los explantes inducidos.	35
8	Efecto de la concentración de BAP en la producción de brotes por planta.	39
9	Efecto del uso de auxinas vs. un tratamiento sin fitoreguladores (testigo) en la producción de raíces <i>in vitro</i>	41
10	Evolución de las plantas en preadaptación por cuatro semanas a condiciones de cuarto de cultivo. a) 0, b) 1, c) 2, d) 3 y e) 4.	422

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Número de especies de cuatro géneros de <i>Agavaceae</i> s endémicas en México y estados del noroeste.....	9
2	Tratamientos evaluados en la fase de multiplicación.....	30
3	Tratamientos en la fase de enraizamiento.	31
4	Plantas procesadas en la fase de inducción	33
5	Clasificación y número de brotes producidos en cada inducción	35
6	Promedio de brotes por explante en cada inducción.....	36
7	Promedio de nuevas plantas entre la inducción y primera multiplicación.....	37
8	Sensibilidad de los brotes a diferentes concentraciones de fitoreguladores.	38
9	Porcentaje de plantas enraizadas por tratamiento	40
10	Efecto de la utilización de auxinas en la longitud y número de raíces	41
11	Porcentaje de sobrevivencia de vitroplantas a la 5ª semana.....	43

RESUMEN

El género *Agave* es endémico del Continente Americano. En México crecen más de 125 taxones de los más de 200 registrados a nivel mundial. Sonora tiene alrededor de 30 especies endémicas de maguey, entre ellas *Agave parviflora* Torr. Esta especie actualmente se encuentra amenazada (NOM-059-SEMARNAT-2010), por la pérdida de su hábitat. El objetivo de este estudio fue diseñar un protocolo de propagación *in vitro* mediante organogénesis directa como método alternativo para su conservación. Se colectaron plantas con apariencia sana y vigorosa, se tomó como explante el meristemo apical del pseudotallo. Se desinfectaron los explantes y colocaron en medio Murashige-Skoog (MS) suplementado con auxinas y citocininas por siete semanas. Plántulas >2 cm se colocaron en medio MS modificado con diferentes concentraciones de 6-Bencilaminopurina (BAP) para su multiplicación. Plántulas >5 cm se indujeron a enraizamiento en medio MS suplementando 0.25 y 0.5 mg L⁻¹ de ácido indolacético (IBA) y ácido naftalenacético (ANA) y un testigo sin fitoreguladores. La aclimatación se realizó en cuartos de cultivo transfiriendo plantas completas a macetas en una mezcla de sustrato. Los datos se analizaron en un diseño completamente al azar con arreglo factorial y estadística descriptiva. La obtención de brotes en el cultivo *in vitro* fue de 12.6 ± 6.2 por explante. La mejor concentración para la multiplicación fue 15 mg L⁻¹ de citocinina (P<0.05), con 24 brotes por planta. Se lograron plantas con mejores raíces en medio MS sin fitoreguladores (P<0.05) y la sobrevivencia de las plantas aclimatadas fue en un 97%.

Palabras clave: *Agave parviflora*, Amenazada, fitoreguladores, micropropagación, Sonora.

ABSTRACT

The genus *Agave* is endemic in the Americas. In Mexico grow more than 125 taxa of the more than 200 registered worldwide. Sonora has about 30 endemic species of agave, including *Agave parviflora* Torr. It is currently threatened (NOM-059-SEMARNAT-2010), due to loss of habitat. The aim of this study was to design a protocol for *in vitro* propagation by direct organogenesis as an alternative method for conservation. Plants were collected with healthy and vigorous appearance. It was taken as explant pseudostem tissue sections. Explants were disinfected and placed in Murashige-Skoog (MS) medium supplemented with auxin and cytokinin for seven weeks. Plantlets >2 cm were inoculated on MS medium supplemented with different concentrations of 6-Bencilaminopurine (BAP) for multiplication. Plantlets >5 cm were induced at rooting on MS medium supplementing 0.25 and 0.5 mg L⁻¹ of indole acetic acid (IBA) and naphthalene acetic acid (ANA) and a control without plant growth regulators. Acclimatization was conducted in growing rooms transferring complete potting plants with substrate mixture. Data were analyzed in a completely randomized design factorial arrangement and descriptive statistics. Multiplication factor was 12.6 ± 6.2 per explant; the best concentration for multiplication was 15 mg L⁻¹ of cytokinin (P<0.05), with 24 buds per plant. MS medium without plant growth regulators was the best for rooting (P<0.05). Survival of acclimated plantlets was 97%.

Keywords: *Agave parviflora*, micropropagation, plant growth regulators, threatened, Sonora.

I. INTRODUCCIÓN

En México se distribuyen alrededor de 150 especies de agave, de las más de 200 que existen a nivel mundial (Gentry, 1982). Los estados más diversos en Agavaceae son, Oaxaca (52 taxones), Durango y Puebla con 43, y Jalisco y Sonora con 40 (Ahumada-Santos *et al.*, 2013). En el noroeste del país se reportan 67 especies endémicas que se distribuyen en Sinaloa y Baja California con 19 especies y Sonora con 29. Entre las especies que crecen en Sonora podemos encontrar a *Agave angustifolia* Haw., *A. bovicornuta*, *A. deserti*, *A. parviflora*, entre otras. Algunas de éstas se han utilizado en la producción de bebidas espirituosas como el pulque, mezcal, sotol, y bacanora. Esta última es emblemática con denominación de origen del estado de Sonora.

Numerosas especies de agave se han cultivado desde tiempos prehispánicos en México. A partir de la época colonial inició su uso como materia prima para la obtención de bebidas espirituosas, fibra, sustancias químicas, entre otras; incluso como ornamentales (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007), lo cual se conserva hasta la actualidad.

Los agaves se caracterizan por ser plantas de crecimiento lento, su propagación suele ser a través de hijuelos adventicios, bulbilos y semillas. Normalmente los primeros hijuelos son emitidos a los tres años de edad de la planta y produciendo posteriormente uno cada año hasta la maduración. La producción de semillas y bulbilos se realiza una vez en el ciclo de vida de la planta al alcanzar la madurez (6 a 10 años). Algunos autores reportan la reproducción sexual como un método ineficiente en el género, debido a que tienen un ciclo de vida que se considera largo, lo que asume una problemática para su desarrollo y producción en viveros porque demanda mucho tiempo, mantenimiento y espacio (Rosales *et al.*, 2008a).

Estas características del género y algunas actividades humanas como la colecta desmedida, la recolección de ejemplares adultos de la naturaleza con fines decorativos, la urbanización, la agricultura, el pastoreo, la construcción de carreteras y la producción de productos secundarios (Martínez-Salvador *et al.*, 2005), han conducido a la destrucción del hábitat y por lo tanto a la amenaza de extinción de algunas especies (Núñez-Noriega y Salazar-Solano, 2009). Este problema se ha observado en la especie *A. parviflora*, actualmente se encuentra en estatus de amenaza por la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010). Lo anterior hace necesario la implementación de tecnologías eficientes para su conservación a través de bancos de germoplasma y/o cultivos *in vitro* que aseguren su prevalencia.

Algunas técnicas de cultivo *in vitro* como la organogénesis, permiten la propagación vegetativa de plantas que conservan características fenotípicas y genotípicas del progenitor, permitiendo la perpetuación de especies nativas en regiones específicas y condiciones óptimas para el desarrollo de éstas (Ángeles-Espino *et al.*, 2012). Así, estas técnicas resultan viables para asegurar el germoplasma y a su vez, su producción eficiente (Eastmond *et al.*, 2000).

La técnica de micropropagación por la vía organogénesis directa a través de meristemos se ha estudiado en otras especies de agave, se ha reportado que es una técnica eficiente para la propagación masiva de plantas. Sin embargo, la mayoría de los protocolos establecidos para la multiplicación masiva *in vitro* por esta vía demuestran que cada especie requiere de condiciones específicas de propagación, tales como: concentraciones y combinaciones particulares de reguladores de crecimiento vegetal, tipo de explante y las condiciones de incubación. La respuesta ante estos factores dependerá de la especie y el tipo de explante para lograr una eficiente generación de vitroplantas (Robert *et al.*, 1992; Hazarika; 2006; Santíz *et al.*, 2012)

II. ANTECEDENTES

II.1 Importancia del Género *Agave*

La familia *Agavaceae* está formada por 9 géneros y 330 especies. Es endémica de América y su centro de origen se encuentra en México donde se localizan 76% de las especies descritas (García-Mendoza, 2007). El género *Agave* perteneciente a esta familia, incluye más de 200 especies y 47 subespecies. Su nombre viene del griego *αγαπή* que significa “admirable”, fue descrita inicialmente por Carlos Linneo en 1753. Se divide en dos subgéneros: *Agave*, con inflorescencia en panícula o umbelada y *Littaea*, en forma de espiga; las especies de mayor importancia económica pertenecen al género *Agave* (Gentry, 1982).

Se ha reportado que al menos 135 especies de agave son endémicas de México (Nava-Cruz *et al.*, 2014). El hombre ha aprovechado especies de este género como alimento, bebidas, herramientas, medicamentos y como material de construcción desde tiempos prehistóricos (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007). Las especies de agave más conocidas, así como las más productivas son: *A. utahensis* Engelm., *A. vilmoriniana* A. Berger, *A. deserti* Engelm., *A. fourcroydes* Lem., *A. sisilana* Perrine, *A. lechuguilla* Torr., *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck, *A. tequilana* Weber. y *A. mapisaga* Trel. (Davis *et al.*, 2011). La mayoría de estas especies se utilizan para producir fibras, cuerdas, jabón y bebidas espirituosas como el tequila, considerándose así al género *Agave* y sus diferentes especies como cultivos muy importantes en México.

II.2 Usos Tradicionales del *Agave*.

Se ha reportado una amplia variedad de usos al género *agave* en las diferentes zonas de distribución de sus distintas especies. El aprovechamiento de esta planta es casi total, la planta entera se emplea como cerca viva y objeto ornamental; el tallo, como alimento; las hojas como material para construcción, forraje, medicamento y fuente de fibra; el escapo floral, como alimento y material de construcción, y las flores y frutos como alimento (Todd, 2009).

II.2.1 Bebidas Alcohólicas

En cuanto a las bebidas espirituosas, estas fueron conocidas desde la antigüedad bajo el nombre de mezcal, un término genérico que viene del nahuatl “mexcallim” (*agave cocido*), es el nombre aplicado a la bebida alcohólica destilada tradicional en muchas zonas rurales de México, desde el norte, en los estados de Sonora y Tamaulipas, y en el sur en Oaxaca.

La explotación del maguey para producir el destilado mezcal se hace en más de 20 estados y se utilizan por lo menos 28 especies de agaves. El producto final puede provenir de la explotación de una sola especie o de la mezcla del alcohol proveniente de varias de ellas. Dos de las especies más utilizadas se cultivan en plantaciones agroindustriales: *Agave tequilana* Weber. (para el tequila, que es un tipo de mezcal) en el estado de Jalisco y *Agave angustifolia* Haw. ampliamente cultivada en el estado de Oaxaca y es la fuente de producción del mezcal comercial producido en México (Gentry, 1982; Valenzuela-Zapata, 2007).

En el estado de Sonora, el bacanora (bebida emblemática con denominación de origen) se elabora con “maguey” (*Agave angustifolia* y *Agave rhodacantha*). La región cultural de la bebida la integran 35 municipios ubicados en la Sierra Madre Occidental. Además se hacen en menor proporción otros mezcales con lechuguilla (*Agave shrevei*), lechuguilla de la sierra (*Agave bovicornuta*) y mezcal ceniza (*Agave colorata*).

Ocasionalmente se usa la tauta (*Agave parviflora*) como saborizante (García-Mendoza, 2012).

Esta práctica implica la extracción del escapo floral y conduce a la supresión total de polen y producción de semillas en estas plantas. En los sitios explotados, para la perpetuación de las especies, se propagan ramificaciones asexuales (hijuelos) provenientes de las plantas maduras. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la extracción constante y amplia de individuos reproductivos, reduce del tamaño efectivo de la población y puede modificar los niveles de la diversidad genética al no permitir la reproducción sexual por semillas (Silva *et al.*, 2008). La baja diversidad genética puede provocar que algunas especies sean incapaces de responder a los cambios ambientales (a través de la adaptación o diversificación) (Kortet y Hedrick, 2007).

II.2.2 Bioactivos

Se han enumerados usos medicinales a las plantas de agave desde la antigüedad y actualmente algunos están siendo estudiados. Dicha actividad es adjudicada a sus componentes bioactivos. Recientemente ha tomado un particular interés entre los investigadores, y es que se han encontrado fundamentos científicos a múltiples aplicaciones médicas de los principios activos y extractos obtenidos de especies de agave. Se han empleados como diuréticos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antiedematosos, anticonceptivos y presumiblemente, hasta anticancerígenos. Algunos resultados permiten suponer que en un futuro cercano ésta sea una alternativa real de uso industrial (Todd, 2009; Ahumada-Santos *et al.*, 2013).

Dentro de los metabolitos secundarios que encontramos como parte de la planta de agave, están triterpenos, esteroides, taninos, cumarinas volátiles, flavonoides, alcaloides, derivados antracénicos libres, cardiotónicos y azúcares reductores (García *et al.*, 2000; Ahumada-Santos *et al.*, 2013).

II.2.3 Ornamental

Las plantas de agave se han utilizado como ornamentales en el paisajismo natural en espacios privados o públicos, esta práctica se está extendiendo rápidamente debido a su belleza, a su bajo consumo de agua y al poco mantenimiento que requieren (Pérez-MolpheBalch *et al.*, 2012).

Las plantas de *A. parviflora*, debido a sus características físicas y morfológicas como su color verde oscuro con un recubrimiento ceroso y atractivas marcas blancas en ambas superficies y los márgenes de la hoja, las hacen atractivas para los coleccionistas y muy apreciadas en interiores o como decoración en jardines (Rosales *et al.*, 2008a).

II.3 Taxonomía y Fisiología del *Agave*

El género *Agave* se encuentra dentro de la familia de las *Agavaceae* monocotiledóneas, pero a veces se incluyen en cualquiera de las *Liliaceas* o *Amaryllidaceae*. Existen muchas variaciones en el género, las hibridaciones han ocurrido con frecuencia a nivel silvestre, por lo que se registran nuevas especies. El número de cromosomas más alto se reporta en las especies con hojas más grandes y tejido más denso de fibras (Davis y Long, 2015). Todas las especies de agave son xerófitas, varían en tamaño desde unos pocos centímetros hasta 4 metros de altura. La planta consiste en una roseta basal de hojas perennes, rígidas y suculentas, generalmente en forma lanceolada con espina terminal y hojas con márgenes espinosos.

Las plantas de agave crecen de forma individual o como poblaciones. Algunas especies de este género usan el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). Las plantas con este tipo de metabolismo fotosintético abren sus estomas por la noche para asimilar CO₂ y utilizarlo para su transformación en ácidos orgánicos, principalmente ácido málico. Durante el día, el CO₂ se libera por descarboxilación de los ácidos orgánicos. Se asimilan entonces en carbohidratos a través del ciclo de Calvin mientras los estomas permanecen cerrados (Nobel, 2011).

La pérdida de agua por la noche es mucho menor en ambientes desérticos y semidesérticos donde las temperaturas nocturnas pueden ser de hasta 20 a 30 °C (Nobel, 2011). En estas condiciones las plantas CAM pierden cantidades menores de agua que una planta no CAM por cada CO₂ que se asimila. Por lo tanto la eficiencia en el uso del agua puede incrementar de 10 a 20 veces más que en las plantas C3 que crecen en el mismo entorno. Esto es muy favorable en ambientes donde el agua es escasa y la luz del sol abundante (Ramírez-Tobías *et al.*, 2014).

Como xerófitas perennes, el agave está adaptado para sobrevivir en condiciones de calor seco, tienen una epidermis cerosa, estomas hundidos y grandes células de almacenamiento de agua en el mesófilo. Las raíces son retractiles y se contraen en respuesta a un bajo potencial de agua en el suelo, dejando un espacio de aire entre la superficie del suelo y las raíces. En consecuencia, junto con la cutícula cerosa gruesa que cubre el follaje, aísla a la planta del aire y suelo seco, lo que le permite mantener un alto contenido de agua a través de largos periodos de sequía (Blunden *et al.*, 1973). Esto es benéfico desde el punto de vista ecológico, ya que permite su supervivencia en condiciones extremas. Sin embargo, se ha demostrado que disminuye el crecimiento de la planta lo que implica que su proceso de maduración será más tardado. Como consecuencia, su aprovechamiento como materia prima (para la elaboración de bebidas como el mezcal) requerirán de más tiempo (Ramírez-Tobías *et al.*, 2014). El periodo de maduración del agave por lo general es alrededor de 8 años como en el caso de *A. tequilana*.

La mayoría de las plantas del género de *Agave* son monocárpicas, es decir, que solo tienen una floración al cabo de la cual la planta muere este proceso puede durar aproximadamente 10 meses (Davis y Long, 2015). El tiempo de vida depende de la especie y puede variar de 8 hasta 20 años (Martínez-Salvador *et al.*, 2005), por lo que se considera una planta longeva y de crecimiento lento. Durante el largo periodo de crecimiento vegetal solo se producen hoja y cuando se inicia la maduración emerge la inflorescencia, la cual dependiendo de la especie observará en la parte más alta en forma de espiga o panoja, donde se encuentran las flores y posteriormente los frutos (Gentry, 1982).

En su área de distribución natural, las plantas de agave hibridan de forma natural con la ayuda de polinizadores que van desde insectos hasta murciélagos (Davis y Long, 2015). La propagación del agave se da por diferentes vías, puede ser por hijuelos provenientes del rizoma, bulbillos y muy rara vez por semillas, ya que éstas tienen una tasa de germinación de alrededor del 33% por lo que se considera que la propagación sexual es limitada o inexistente. Comúnmente se cultiva de forma asexual por medio de hijuelos que emite la planta madre (Nava-Cruz *et al.*, 2014).

II.4 Distribución

El género *Agave* L. (*sensu stricto*) es endémico de América, su distribución abarca del sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela. Esta área incluye todas las islas del caribe, desde las Bahamas a Aruba, Curacao y Trinidad y Tobago. Los países con el mayor número de taxones son México, Estados Unidos, Cuba y Guatemala; los demás tienen menos de ocho especies, cifra que representa menos de 3% del total (García-Mendoza, 2007).

En México, el género agave tiene una amplia distribución, se encuentra en más de 75% del territorio, sin embargo, su distribución es altamente asimétrica, hay regiones que poseen más especies que otras. Son muy diversos en las provincias áridas y semiáridas del centro y norte.

Algunos autores han mencionado que existen 166 especies reconocidas, unos 200 y otros 273 especies de agave diferentes en el Continente Americano, por lo que hasta el año 2010 el número de especies de agave reportadas en México fue controversial. Algunas especies crecen en un área específica y otros están ampliamente distribuidos. Por ejemplo, el agave del que se obtiene el mezcal (*A. potatorum*) se encuentra comúnmente en la mayoría de los estados del país, excepto en Tabasco y la península de Yucatán (Nava-Cruz *et al.*, 2014). Los estados con mayor diversidad de especies son Oaxaca (37), Puebla (31), Sonora (30), Querétaro (26) y Durango (24). Hay un importante componente endémico en la diversidad de agaves en México. De los más de

200 taxones, 129 son endémicos de este país, lo cual representa 69% (García-Mendoza, 2007).

II.5 Especies y Subespecies Endémicas de Sonora

En el estado de Sonora existen 40 géneros endémicos de la familia *Agavaceae* entre los cuales podemos encontrar al *Hesperaloe*, *Manfreda*, *Yucca* y *Agave* (Cuadro 1). En términos del género *Agave* crecen 29 especies que se encuentran ampliamente distribuidas en el estado, entre las cuales podemos encontrar al maguey bacanora (*A. angustifolia* Haw.), maguey de duna (*A. aktites* Gentry.), lechuguilla (*A. bovicornuta* Gentry.), maguey del desierto (*A. deserti* Engelm), maguey de jardín (*A. desmettiana* Jacobi.), amole (*A. vilmoriniana* Berger), lechuguilla ceniza (*A. shrevei* Gentry.) y tauta (*A. parviflora* Torr.) (García Mendoza, 1995).

Cuadro 1. Número de especies de cuatro géneros de *Agavaceae*s endémicas en México y estados del noroeste.

Género	México	Noroeste	Endémicas	Sonora	Sinaloa	Baja California
<i>Agave</i>	125	48	33	29	19	19
<i>Hesperaloe</i>	3	1	1	1	0	0
<i>Manfreda</i>	27	3	3	3	2	2
<i>Yucca</i>	30	10	10	7	0	3
TOTAL	217	62	62	40	21	24

II.6 Especie *Agave parviflora* Torr.

Esta especie se caracteriza por ser la más pequeña del género agave, cuyo nombre local es reportado como “tauta”, “tautilla” y “sóbali” o “sobari”, se dice que son los más dulces y más comestibles de los mezcales silvestres, cuando son apropiadamente cocidas, sin embargo, son raramente usados debido a su diminuto tamaño. Todas las subespecies son atractivas como plantas ornamentales (Gentry, 1982).

II.6.1 Descripción Botánica y Fisiológica

Consiste en una roseta pequeña, simple o cespitosa de 10-15 cm de altura y 15 a 20 cm de ancho. Sus hojas miden de 6-10 cm de largo y 0.8-1 cm de ancho son oblongo-lineales, planas en la parte superior, convexas en la parte inferior. Su color es verde con marcas blancas en el haz, margen filífero blanco (margen con fibras blancas gruesas), finamente dentado cerca de la base (Figura 1).

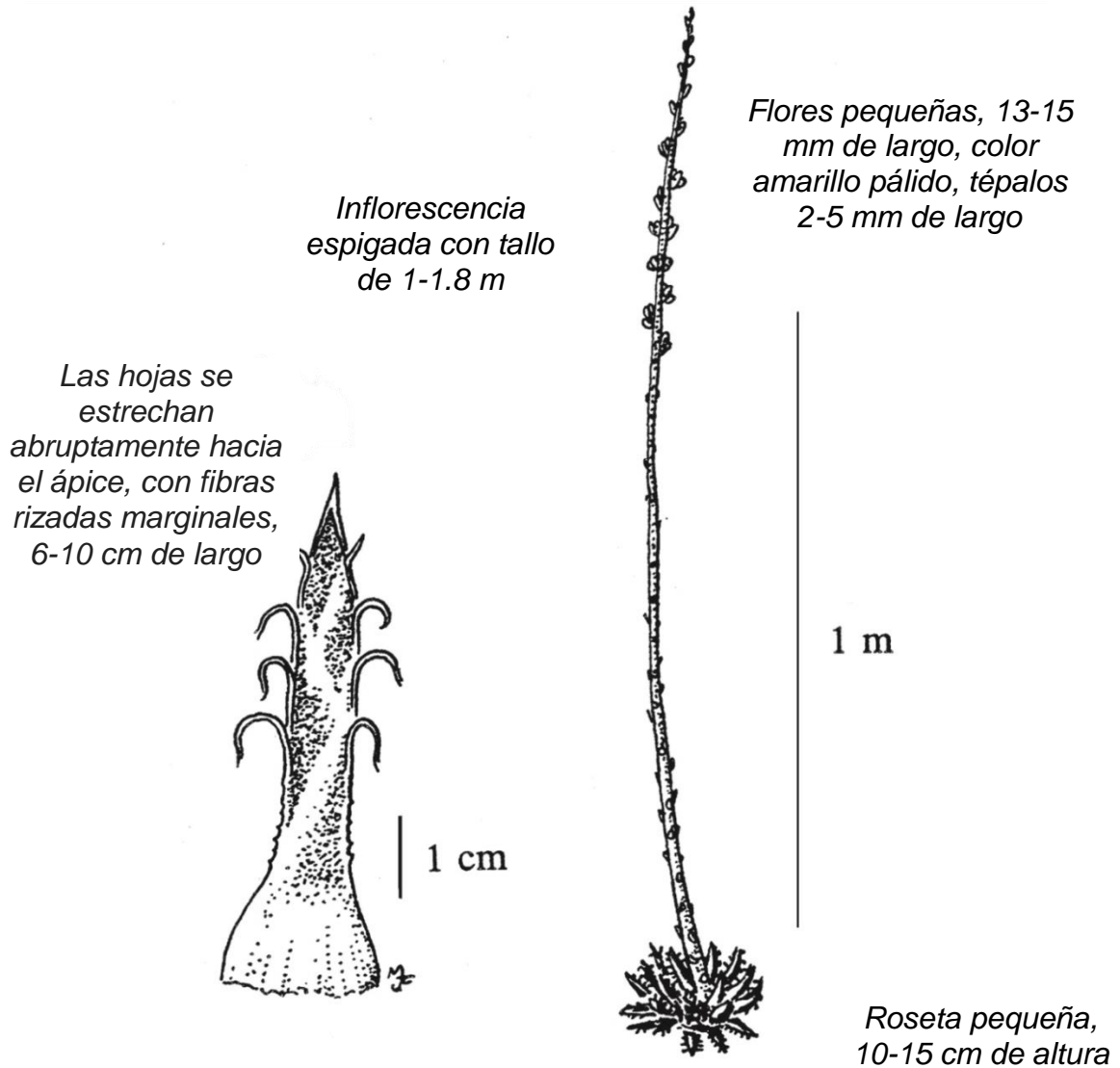


Figura 1. Descripción grafica de las características botánicas de *A. parviflora* Torr. (Arizona Rare Plant Committee, 2000)

Sus espinas miden de 5-8 mm de longitud, débilmente subulada, parda a blanco grisácea. La inflorescencia mide de 1-1.8 m de alto, es laxa, fértil a lo largo de la mitad superior del pedúnculo, el cual es frecuentemente rojizo. Las brácteas disminuyen el tamaño hacia la parte apical, escariosas, subuladas, de base ancha deltoides, efímeras.

Las flores son de 13-15 mm de longitud, color amarillo pálido; ovario de 4-5 mm de longitud. Los frutos miden de 6 a 10 mm de diámetro, orbiculares a oblongos, sésiles a cortamente pedicelados. Las semillas miden de 3x2.5 mm, son hemisféricas y negras (Trelease, 1894; Gentry, 1982). Existen dos variedades de la especie *parviflora* que se reconocen con las siguientes características: *A. parviflora* ssp. *parviflora* Torr. consisten en rosetas de 10-15 cm de alto, 15-20 cm de ancho. Hojas 6-10 cm de largo, 0.8-1 cm de ancho, oblongos-lineares. Inflorescencia espigada de 1-1.8 m de alto; flores de 13-15 mm de longitud. Los frutos miden de 6-10 mm de diámetro, orbiculares a oblongos, sésiles a cortamente pedicelados. Semillas 3x2.5 mm hemisféricas negras. Crecen en climas templados en altitudes de 900-1430 m, florece en mayo y agosto y fructifican en agosto-diciembre (Gentry, 1982).

A. parviflora ssp. *flexiflora* se diferencia de la subespecie *parviflora* por tener flores hacia abajo flexionadas, tépalos más largos, y hojas de mayor tamaño (Starr y Van Devender, 2011). Estas consisten en rosetas pequeñas con hojas de 15-18 cm de largo, 1.2 cm de ancho, linear o lanceoladas. Inflorescencia de 1.5-2.5 m de alto; flores de 14-17 mm de longitud. Frutos de 8-10 mm de diámetro, orbiculares no estipitadas, apiculadas. Semillas 3x2 mm hemisféricas o irregulares. Crece en climas templados, en altitudes de 900-1200 m. Florece en mayo-junio y fructifica en septiembre (García-Mendoza, 2003).

II.6.2 Distribución

Se han reportado algunas subespecies de *A. parviflora* distribuidas en distintos puntos del estado. Existen tres subespecies de *A. parviflora* en Sonora: *A. parviflora* ssp. *densiflora* en el área de Maycoba en el este de Sonora, *A. parviflora* ssp. *flexiflora* que se encuentra en el área de Mátape a Moctezuma hacia el este en la parte de Nácori chico

y hasta Huásabas. y *A. parviflora* var. *parviflora* ésta se encuentra en el sur de Arizona y la parte adyacente de Sonora. Su área principal es el área de Moctezuma, Mátape a Bacadéhuachi y Huachineras (Molina-Freaner y Van Devender, 2010).

Su distribución abarca la Sierra Pajarito, noroeste de Nogales, oeste de Moctezuma; suroeste de lago de Peña Blanca, Peña Blanca (Gentry, 1982). *A. parviflora* ssp. *flexiflora* se puede encontrar cerca de Huásabas (270 Km. al sureste de las montañas de Pajarito) en el noreste de Sonora (Starr y Van Devender, 2011). *A. parviflora* ssp. *parviflora* crece en laderas rocosas, sitios abiertos del bosque de encino-pino, sobre suelos derivados de roca volcánica; mientras que *A. parviflora* ssp. *flexiflora* crece en bosques de encino y pastizales, sobre roca volcánica en colinas bajas rocosas y sobre acantilados volcánicos (García-Mendoza, 2003).

II.6.3 Propagación

Agave parviflora produce hijuelos a través del rizoma adventicio con moderación durante su crecimiento antes de la maduración (4-5 años) (García-Mendoza, 2007). Las rosetas permanecen verdes durante 1 a 2 años después de la floración, pero no se ha observado la producción de hijuelos en el período post-floración. Al iniciar la maduración emerge la inflorescencia que en esta especie terminará en forma de espiga y no en panícula como en otros agaves. Las flores maduran a finales de primavera hasta el verano y son polinizadas por abejorros y abejas. Las semillas se liberan gradualmente de las cápsulas secas (frutos secos) durante el otoño y el invierno como sucede en la mayoría de los agaves (Figura 2).

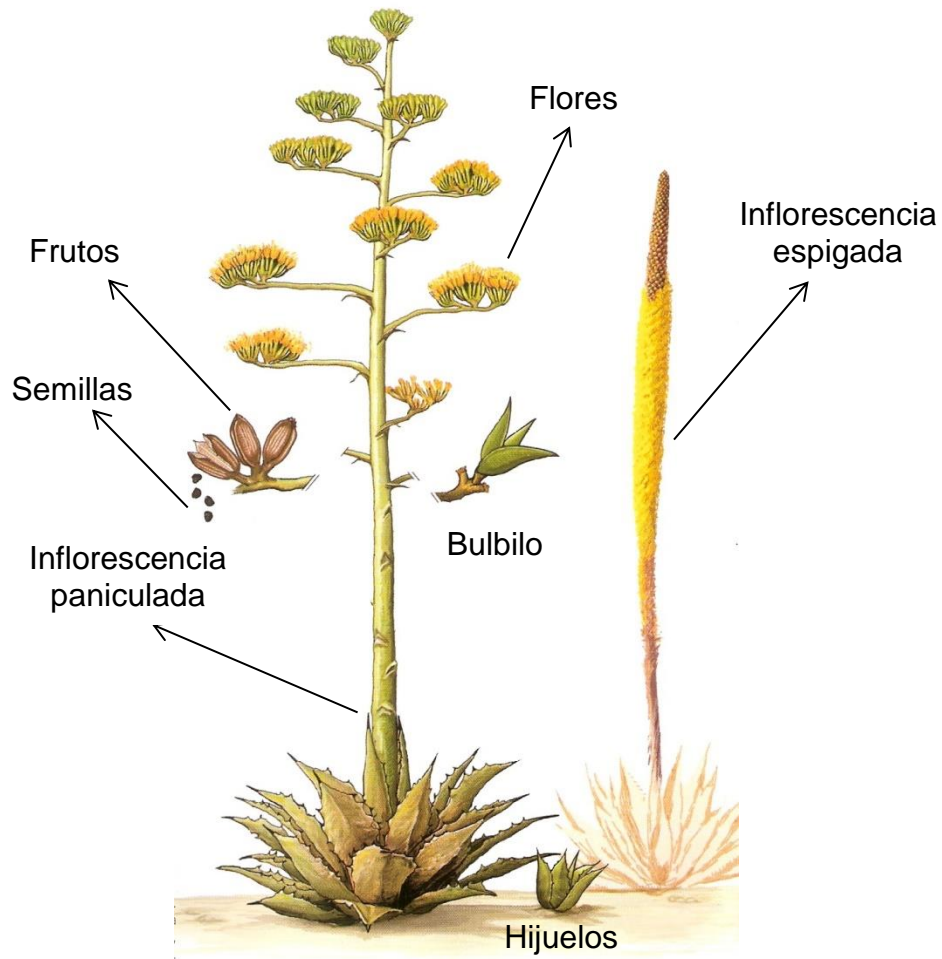


Figura 2. Tipos de inflorescencias y propagación convencional del género *Agave*. (CONABIO, 2006)

II.6.4 Situación Actual de la Especie

El hábitat de esta especie se ha visto destruido y fragmentado por su baja propagación y la intervención humana; como la urbanización, la agricultura, el pastoreo, la construcción de presas y carreteras; así como la recolección desmedida de plántulas y ejemplares adultos silvestres con fines decorativos (Martínez-Salvador *et al.*, 2005), por lo que en la actualidad se considera una especie endémica del estado de Sonora amenazada (Van Devender *et al.*, 2013) por la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010).

II.7 El Cultivo de *Agave parviflora* Torr. y sus Limitaciones

Agave parviflora Torr. es una planta bien adaptada a condiciones climáticas extremas de su hábitat. Esto es debido al metabolismo ácido de las crasuláceas que le permite resistir una exposición total al sol y requiere de poca agua para sobrevivir. Además, debido a la acumulación de inulina (principal polisacárido de agaves), presenta alta resistencia al congelamiento, pudiendo sobrevivir hasta a -12 °C. Lo que asegura su prevalencia ante las condiciones climatológicas adversas. Sin embargo los cambios en su hábitat ha llevado a la reducción de su población además de su naturaleza monocárpica lo cual significa que tiene un único evento de producción de flores y semillas (Gentry, 1982). Esto supone un problema para su propagación vegetativa y sexual.

La propagación vegetativa o asexual se considera lenta y presenta desventajas en cuanto a su reproducción, ya que cada planta empieza a producir hijuelos hasta la edad de tres años en adelante y sólo producen un promedio de seis plántulas por cada planta adulta, mientras que los propágulos (bulbilos) requieren de un mínimo de siete años para su probable aparición (Gentry, 1982; Rosales *et al.*, 2008a). Por otra parte, la reproducción sexual se realiza a base de semillas, y por lo tanto requieren también un mínimo de seis años para que las plantas maduren y produzcan semillas.

Agave parviflora es una especie aun no domesticada, por lo que los individuos se extraen de las poblaciones naturales, lo que ha provocado el declive de éstas poblaciones. Actualmente varias especies de agave se encuentran amenazadas debido a actividades como estas, por lo que la NOM-059-SEMARNAT-2010 incluye a 18 especies bajo este estatus (Pérez-MolpheBalch *et al.*, 2012).

Esta problemática se ha visto en *A. parviflora* Torr. que se encuentra bajo estatus amenazada, haciendo necesario el tomar medidas concretas y eficaces para garantizar la conservación de esta especie y a la vez permitir su explotación racional. Algunos programas de aprovechamiento sostenible de agave proponen acciones de recuperación de las poblaciones para la protección de éstas y otras especies de *Agave* bajo este estatus (Rangel-Landa *et al.*, 2015). Para la recuperación, se ha sugerido la aplicación de la biotecnología vegetal implementando estrategias de cultivo *in vitro* específicas para

determinadas especie de *Agave* para la producción masiva de plantas en lapsos cortos y lo más importante conservando características genotípicas de dichas especies para la conservación del germoplasma (Ángeles-Espino *et al.*, 2012).

II.8 Cultivo de Tejido *in vitro* de *Agave*

El cultivo de tejido *in vitro* consiste básicamente en cultivar pequeños segmentos de las plantas (explantes) sobre medios sintéticos estériles bajo condiciones controladas, con el propósito de generar plantas con las características genotípicas del progenitor (Robert *et al.*, 2006). Esto es posible a partir de cualquier parte de la planta: meristemos, tallos, raíz, hojas, inflorescencias etc. También se pueden obtener plantas completas a partir de células aisladas o protoplastos en suspensión, siempre y cuando dichas células conserven su capacidad para reasumir su actividad meristemática.

El cultivo de tejidos vegetales surgió como una técnica rápida de propagación de plantas. Además se ha estudiado su uso como herramienta para resolver problemas de nutrición vegetal, sin embargo su aplicación biológica en la detección y estudio de sustancias naturales activas ha sido más aplicadas (Murashige y Skoog, 1962; Pérez-MolpheBalch *et al.*, 1999).

La aplicación de la biotecnología vegetal en cultivo de tejido y la multiplicación de plantas ha sido dirigida particularmente a la producción de plantas libres de patógenos en variedades de alto valor económico, así como en los estudios de transformación genética (Rout *et al.*, 2000). Sin embargo el éxito final de la propagación *in vitro* a escala comercial depende la eficiencia de los protocolos, las bajas tasas de contaminación y la capacidad de transferir *ex vitro* las plantas de cultivo a gran escala, a un bajo costo y con altas tasas de supervivencia (Hazarika, 2006).

Las plantas cultivadas *in vitro* son generalmente susceptibles a la crisis de trasplante a suelo. Lo que conduce a una alta mortalidad, debido a que las plántulas desarrolladas dentro de los recipientes de cultivo en condiciones de bajo nivel de luz, asépticas, en un medio que contiene cantidades suficientes de azúcar y nutrientes para

permitir el crecimiento heterótrofo y en una atmósfera con una humedad relativa alta puede contribuir a un fenotipo que no puede sobrevivir a las condiciones ambientales cuando se colocan directamente en un invernadero o campo. La comprensión de estas anomalías en el cultivo *in vitro* de plantas es un requisito previo para desarrollar protocolos de trasplante eficientes (Hazarika, 2006).

II.9 Métodos más Utilizados

Antes de elegir el método a utilizar es importante seleccionar el tipo de explante que se utilizará según los objetivos que se persigan en el estudio, ya que la selección de la parte de la planta a cultivar dependerá si se desea realizar una propagación masiva, mejoramiento genético, mutagénesis, producción de metabolitos, etc. Se pueden distinguir dos tipos de explante: organizados: meristemos, yemas, embriones, anteras, óvulos etc., no organizados: segmentos de algún órgano.

La regeneración de plantas *in vitro* ha sido ampliamente estudiada en diferentes especies de agave, esta regeneración puede conseguirse por tres diferentes procesos, que son la proliferación de yemas axilares, la organogénesis y la embriogénesis somática. En la proliferación de yemas axilares se promueve el desarrollo de los puntos de crecimiento ya existentes en las plantas. Esta técnica supone mantener la fidelidad genética de la descendencia con respecto a la planta madre, ya que la variación somaclonal está prácticamente ausente cuando se cultivan estructuras organizadas como meristemos y yemas, por lo que puede considerarse que este es el sistema ideal para la propagación clonal de cultivares (Pérez-MolpheBalch *et al.*, 1999).

Durante el proceso de organogénesis se da la formación de órganos (brotes y o raíces) en dos eventos en tiempos diferentes cada uno de ellos, y sugiere mayor probabilidad de no perpetuarse la fidelidad clonal con respecto a la proliferación de yemas axilares. En la embriogénesis somática se produce una estructura bipolar definida, es decir la aparición de una planta completa en un solo evento. La probabilidad de producirse variantes en la descendencia se supone es muy similar a la organogénesis

(Santacruz-Rubalcaba *et al.*, 2008). Estas dos últimas vías (organogénesis y embriogénesis) se han realizado de manera directa e indirecta.

II.9.1 Organogénesis Directa

La organogénesis directa es la formación de plantas nuevas a partir de tejido meristemático presente en el explante, bajo la influencia de reguladores de crecimiento, las células empiezan a dividirse de manera organizada que le da la posibilidad de generar brotes (sin raíces). Se pueden generar muchos brotes a partir de cada explante, pero el verdadero proceso de multiplicación empieza cuando los éstos son separados e inducidos a formar una nueva generación que crecerán en la bases del brote generado (brotes adventicios). Este proceso se repite una y otra vez incrementando su número a partir de los obtenidos de la planta madre (clon) (Robert *et al.*, 2004).

La multiplicación *in vitro* a través de yemas o meristemos, es una estrategia que permite la multiplicación masiva de plantas, las cuales además de ser genéticamente uniformes e idénticas a la planta madre, tienen la ventaja de ser plantas libres de patógenos (Núñez-Noriega y Salazar-Solano, 2009).

II.9.2 Organogénesis Indirecta

La organogénesis indirecta es la formación de nuevos brotes, pero no directamente de tejidos organizados extraídos de la planta si no de un tejido intermediario amorfo indiferenciado llamado callo. La formación de plantas a través de callos representan una alternativa para la producción de masas indiferenciadas, que son un conjunto de callos que pueden crecer rápidamente para forman millones de células de las que en teoría podrían formar millones de nuevas plantas (Robert *et al.*, 2004).

Sin embargo este método, presenta serias desventajas, desde crecimiento desorganizado hasta mutaciones y producir variantes en las nuevas plantas, las cuales no son deseables en líneas clonales. La organogénesis indirecta a menudo induce la variación somaclonal y permite inducir características diferentes que no están

expresadas normalmente en la naturaleza o bien eliminar alguna indeseable (Ángeles-Espino *et al.*, 2013; Rodríguez-Beraud *et al.*, 2014). Este método es adecuado para generar plantas con características diferentes al progenitor. Por otra parte, los callos pueden ser utilizados para hacer suspensiones celulares para la producción de embriones somáticos. Normalmente, esta vía requiere de una elevada concentración de auxinas en la etapa de inducción de callo (Trabelsi *et al.*, 2011).

II.9.3 Embriogénesis Somática

La embriogénesis somática es la formación de embriones a partir de células somáticas. Esta difiere de la embriogénesis normal porque este no es el producto de la fusión de un gameto femenino con otro masculino que resulta después de la polinización, sin embargo el desarrollo organizado de una célula indiferenciada da lugar a un embrión. Por otro lado, se diferencia de la organogénesis por que el resultado final no es un brote o una raíz, pero una planta completa en sus primeras etapas de desarrollo, una pequeña semilla artificial que dará lugar a una planta completa (Robert *et al.*, 2004). Sin embargo, la embriogénesis somática ocurre en la naturaleza en más de 60 familias de plantas (incluyendo crucíferas, cucurbitáceas, leguminosas, palmáceas etc.) Su relevancia para la biotecnología se basa en el hecho de que puede ser inducida a partir de células somáticas cultivadas *in vitro* (Robert *et al.*, 2004).

La embriogénesis somática podría ocurrir directamente de las células de un explante (embriogénesis somática directa) o vía callo (embriogénesis somática indirecta). Es considerada una poderosa herramienta para la regeneración y mejoramiento genético de plantas. Este proceso morfogénico se favorece mediante la transferencia de los explantes de un medio de cultivo suplementado con altas concentraciones de auxinas, a uno libre de este tipo de reguladores del crecimiento (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011).

II.10 Uso de Fitoreguladores en el Cultivo *in vitro*

El uso de fitoreguladores u hormonas de crecimiento ha sido muy estudiado en el establecimiento de protocolos de micropropagación en diferentes especies de agave. Las más utilizadas son algunas citocininas y auxinas para inducir brotes, promover el crecimiento e inducir el enraizamiento *in vitro*, estas se adicionan a medio basal Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) y agar como gelificante. Las citocininas más utilizadas son: 6-Bencilaminopurina (BA), 6- γ,γ -Dimetilalilaminopurina (2ip), Cinetina (Cin), Tiazurón (Tdz) y Metatopolina o n6-(Meta-hidroxi-bencil) adenina (mt), solas o combinadas con auxinas como el 2, 4-Diclorofenoxiacético, Ácido Indol-3-Acético (AIA), Ácido Naftalenacético (ANA) y Ácido Indolbutírico (AIB). (Rosales *et al.*, 2008a).

Es posible hacer modificaciones en cada una de las etapas de un protocolo de propagación *in vitro* para incrementar la eficiencia de éste y la calidad de las plantas, por lo que es conveniente evaluar el efecto de variar la concentración de los componentes de un medio de cultivo como las sales minerales del medio y la aplicación exógena de reguladores de crecimiento (Luna *et al.*, 2013).

Estos fitoreguladores se han utilizado a muy bajas concentraciones en diferentes fases del cultivo *in vitro*. Por ejemplo, en un estudio realizado en Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) se han analizado otras combinaciones de hormonas como la de 6-Bencilaminopurina (BAP) (0,75 mg L⁻¹) y Ácido Indolbutírico (IBA) (1,0 mg L⁻¹) en lugar de Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) en la supervivencia explante y durante el establecimiento *in vitro* de brotes jóvenes la combinación de Tiazurón (Tdz) (0.5 ó 0.75 mg L⁻¹) con BAP (1.0 mg L⁻¹) en el cual, se observó un aumento en la tasa de multiplicación y aceleró la brotación. Para mejorar el enraizamiento de los brotes micropropagados, se estudió la adición IBA y ANA, observándose mayor eficiencia de enraizamiento cuando el medio basal se suplementó con 0.5 o 0.75 mg L⁻¹ de ANA (Caraballo *et al.*, 2010).

De acuerdo a estudios realizados en diferentes especies de agave es necesario aclarar que el efecto de las hormonas sobre los explantes inducidos dependerá mucho de

la especie y la selección del explante a micropropagar, así también del tipo de estudio que se desee realizar.

II.11 Establecimiento de Protocolos de Micropropagación *in vitro* de *Agave*

Un protocolo es la mejor metodología disponible en un cierto tiempo para hacer frente a un problema específico, es un procedimiento que tiene que ser adaptado a los tejidos que difieren en sus condiciones genéticas y fisiológicas con el fin de obtener los mejores resultados posibles de ellos. La mayoría de los protocolos establecidos para la multiplicación masiva *in vitro* vía organogénesis demuestran que cada especie de agave requieren de condiciones específicas; tales como, concentraciones y combinaciones particulares de reguladores de crecimiento vegetal además que la respuesta a estos depende del tipo de explante para lograr una eficiente generación de vitroplantas (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011).

II.11.1 Selección de la Planta Madre

Este paso implica la obtención del explante de una planta madre, seleccionada de una población, con base a las características fenotípicas y genotípicas deseables para las clonas que se generaran. Se utilizan hijuelos jóvenes provenientes del rizoma adventicio de las plantas elegidas, o bien bulbilos provenientes del escapo floral para evitar la pérdida de la diversidad genética, sin embargo, otras pueden usar segmentos de hoja de la planta madre para promover la inducción de respuestas morfométricas *in vitro* (Luna *et al.*, 2013).

II.11.2 Selección del Explante

Para el caso de agaves los tallos viejos de las plantas no son fuentes de explantes convenientes para la iniciación de cultivo de tejido de agave, esto son duros y fibrosos tienen meristemas lignificado y probablemente sean infectados con algún

microorganismo. Por otro lado la selección de materiales de élite debe llevarse a cabo en las plantas que tienen edad suficiente para mostrar la gama completa de sus características ventajosas (superiores) (Robert *et al.*, 2004).

II.11.3 Extracción del Tejido Meristemático

Antes de extraer el tejido meristemático del agave en estudio, se lava con jabón para retirar los residuos de tierra que podrían traer de campo. Tanto como sea posible se remueve el tejido externo (raíces y parte de las hojas) con la ayuda de un cuchillo dejando libre la sección media de la estructura basal del agave, ésta sección de tejido tendrá forma de cubo de 6 a 8 cm (el tamaño dependerá de la especie y de la edad de la planta madre). La base de las hojas centrales o últimas hojas se mantienen intactas en su lugar al formar el cubo en esta etapa, para proteger el tejido meristemático que se encuentra debajo de ellos. Los cubos de tejido meristemático extraídos de los tallos se remojan en tween 20 al (2%) por 30 min antes de llevarlo a condiciones estériles (campana de flujo laminar) (Robert *et al.*, 2006).

II.11.4 Desinfección del Explante

El tejido meristemático extraído para su cultivo *in vitro* deberá ser desinfectado, al mismo tiempo que se deberá controlar el crecimiento microbiano. El método de esterilización y corte del explante se describe enseguida (Robert *et al.*, 2006):

1. Una vez que se pasan a condiciones de esterilidad, los tallos obtenidos de las plantas madre (cubos) se lavan con jabón comercial al 40% (conteniendo 5% de hipoclorito de sodio activo NaClO) por 30 min, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril.
2. Se cortan los cubos en secciones pequeñas, cubos menores de 0.8 cm³ aproximadamente.
3. En algunos casos, donde los explantes son particularmente difíciles de lavar, los cubos pequeños podrían sumergirse en jabón al 2% antes de enjuagarse a fondo con

agua destilada estéril, después de este proceso se colocan los explantes den forma de cubo en los medios de cultivo.

4. Al final, el número de explantes extraídos dependerá del tamaño de la base del pseutallo de la planta madre.

II.11.5 Inducción

En la micropropagación de *A. tequilana* y *A. fourcroydes*, el explante que fue reducido a pequeños cubos de 0.8 cm³ aproximadamente, se incuba en recipientes que contienen medio MS-b (MS con nitrógeno reducido) suplementado con auxinas, citocininas y agar al 8%. Los explantes son incubados en cuartos de cultivo a 27 ± 2 °C, 16 horas de fotoperiodo por 8 a 12 semanas hasta que formen nuevos brotes en la superficie del explante. Los primeros brotes comienzan a aparecer después de cinco y/o 12 semanas, se observan alrededor de tres a 12 nuevos brotes adventicios completos con un mínimo de dos hojas que varían en tamaño de 0.5 a 2.0 cm se observarán formados en cada explante (Robert *et al.*, 2004)

II.11.6 Multiplicación

Esta etapa representa el núcleo del protocolo, puesto que es en la que se incrementara el número de plantas a las cantidades que se necesita micropropagar. El factor de multiplicación (número medio de nuevas plantas que se producen en cada transferencia) determinara cuantas transferencias podrían requerir y cuánto tiempo se tardará en producir un cierto número de plantas (Robert *et al.*, 2004).

II.11.7 Subcultivo

Los nuevos brotes son muy variables en tamaño y es muy recomendado que se clasifiquen y se transfieran por separado a fin de mantener la mayor homogeneidad posible en las cajas de cultivo. La clasificación será de pequeño para los brotes de 0.5-

1.0 cm, mediano para los de 1.0 a 2.0 cm, y grande a los brotes que midan más de 2 cm. Los primeros dos tamaños se pueden transferir al medio de multiplicación para continuar aumentando la biomasa o se pueden transferir a un medio de crecimiento para que puedan alcanzar el tamaño adecuado para preadaptación. Los grandes se pueden transferir directamente al crecimiento y preadaptación. El ciclo se puede repetir tantas veces como sea necesario para producir el número necesario de plantas para cada línea de cultivo (Smith, 2013)

II.11.8 Establecimiento *ex vitro*

La eficiencia de un sistema de micropropagación por la vía embriogénica u organogénica, dependerá de su éxito en el trasplante a suelo. Poco serviría si el porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* de las plantas generadas es bajo (Santíz *et al* 2012), por lo que se hace necesario evaluar el desarrollo de las plantas a condiciones controladas de invernadero (aclimatación) con la finalidad de evitar o reducir la pérdida de humedad de las vitroplantas durante un tiempo determinado y posteriormente se trasladan a casa sobras para su endurecimiento y adaptación a las condiciones ambientales normales de la región. Bajo estas condiciones se evalúa el porcentaje de sobrevivencia, la vigorosidad y el crecimiento activo de las plantas.

III. JUSTIFICACIÓN

Los protocolos establecidos de micropropagación *in vitro* por organogénesis directa en algunas especies de *Agave* han demostrado ser una alternativa viable para su propagación escalada. Su estudio se ha basado en factores como la edad y tipo de explante, la relación entre fitohormonas y las condiciones de incubación, logrando establecer exitosamente plantas sanas y vigorosas en campo, conservando las características genotípicas idénticas al progenitor. Así, considerando estos factores críticos en el protocolo, esta técnica podría ser una alternativa de propagación y conservación de *Agave parviflora* Torr.

IV. HIPÓTESIS

La utilización de concentraciones adecuadas de auxinas y citocininas permitirán establecer un protocolo de propagación *in vitro* de *Agave parviflora* Torr. mediante organogénesis directa

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo General

Establecer un protocolo de propagación *in vitro* de *Agave parviflora* Torr. mediante organogénesis directa utilizando auxinas y citocininas, para coadyuvar a la conservación de la especie

V.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la respuesta del meristemo apical del pseudotallo de *Agave parviflora* ante los fitoreguladores auxina y citocinina en la inducción de brotes.
- Determinar la concentración óptima de auxinas y citocininas que permita obtener el mayor factor de multiplicación de plántulas.
- Obtener la concentración óptima de auxina en la inducción de raíces *in vitro*.
- Determinar el índice de supervivencia *ex vitro* de las vitroplantas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Recolección de Material Vegetativo

Se recolectó el material vegetativo en el municipio de Nácori Chico, Sonora (29°41'18'' LN, 108°58'53'' LO; altitud 832 msnm; temperatura media anual de 29 °C; y precipitación pluvial de 490.8 mm) (INEGI, 2015). Se recolectaron plantas con apariencia sana y sin presencia del escapo floral y se mantuvieron en macetas en casas sombra hasta su procesamiento (inducción) (Figura 3). La identificación de los ejemplares colectados se llevó a cabo mediante las claves morfométricas y morfológicas descritas por Gentry (1982) y Starr y Van Devender (2011) para la especie *Agave parviflora* Torr.



Figura 3. Área de colecta del material vegetal.

VI.2 Preparación del Material Vegetativo

El material vegetativo se trasladó al Laboratorio de Micropropagación del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. y se siguió el protocolo establecido por Robert *et al.* (2004), para la preparación del tejido vegetal. Se eliminaron hojas y raíces de la planta para la extracción del pseudotallo, se lavó el tejido resultante con jabón comercial y abundante agua para eliminar residuos de tierra provenientes de campo.

Una vez obtenido el pseudotallo limpio, en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar (Labconco® Purifier™ Clean Bench, USA) se desinfectó, sumergiendo el tejido en una solución de cloro comercial (Cloralex®) al 30% por 15 min, agitando constantemente con un termoagitador. Transcurrido el tiempo se le aplicó un triple enjuague con agua destilada estéril. Posteriormente con la ayuda de un bisturí estéril y una caja petri de vidrio, se eliminaron los bordes del tejido dañado durante proceso. Se extrajo la zona meristemática para obtener explantes en forma de cubos de 0.8 cm³ aproximadamente.

VI.3 Inducción

En esta etapa, se consideró como medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con auxina 2,4-Diclorofenoxiácetico (2,4-D) y citocinina 6-Bencilaminopurina (BAP), a diferentes concentraciones para ambos fitoreguladores, 0.025 mg L⁻¹ y 10 mg L⁻¹ respectivamente, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 8g L⁻¹ agar-agar (Agarmex, Mex), con el pH ajustado a 5.7. Posteriormente se dosificó en magentas de 7.7 × 77 × 9.7 cm (Magenta™ vessel GA-7 Sigma-Aldrich®) con un volumen de 50 ml y se esterilizó por 15 min a una presión de 20 lb/pulg² en autoclave. Se inoculó un explante por magenta. Los recipientes cerrados se sellaron con plástico adherente (Pétalo® Kleen Pack) para evitar contacto con el ambiente exterior y la contaminación.

VI.4 Incubación

Los medios inoculados con los explantes se transfirieron e incubaron de cuatro a ocho semanas a un cuarto de cultivo con temperatura 25 ± 2 °C y fotoperiodos de 12 h. Se evaluó semanalmente el comportamiento. Transcurridas cinco semanas se contabilizó el número de brotes por explante, así como el porcentaje y tipo de contaminación. Se clasificaron los brotes acorde a las tallas propuestas por Robert *et al.*, (2004) adaptada para *Agave parviflora* Torr. con las características descritas a continuación: Pequeño (C1): 0.5-1 cm; Mediano (C2): 1.1-3 cm; Grande (C3): 3.1-5 cm (Figura 4).

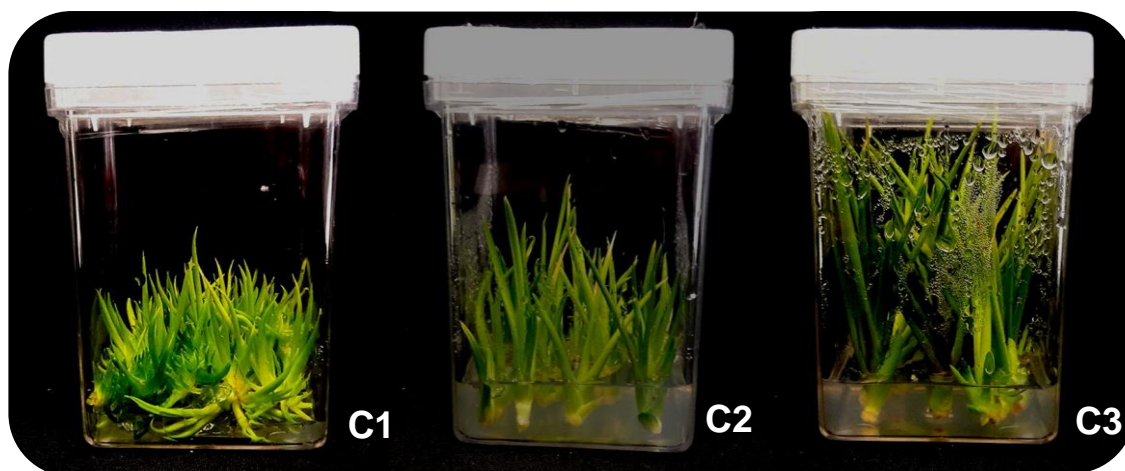


Figura 4. Separación de botes según su crecimiento en medio MS.

VI.5 Factor de Multiplicación

Se calculó el factor de multiplicación (FM) que se observó entre las fases de inducción y la primera transferencia a medio de multiplicación en medio MS suplementado con 10 mg L^{-1} de BAP y 0.025 mg L^{-1} de 2, 4-D durante ocho semanas para la producción de biomasa necesario para las siguientes fases, se contabilizó el número de plantas en tiempo inicial y el registrado en tiempo final, el cálculo se realizó utilizando el número de plantas obtenido en la fase de multiplicación dividido entre el número de plantas registrado en la fase de inducción.

VI.6 Multiplicación

Los brotes producidos en la fase de inducción se clasificaron según su talla y se transfirieron a medio MS suplementado con diferentes concentraciones de fitoreguladores (auxina:citocinina) para su multiplicación (Cuadro 2). Se mantuvieron en cuartos de cultivo bajo las condiciones antes descritas y después de ocho semanas, se contabilizaron los brotes por tratamiento para establecer la mejor concentración con mayor coeficiente de multiplicación y plántulas con las mejores características basadas en la talla y el número de nuevos brotes.

Cuadro 2. Tratamientos evaluados en la fase de multiplicación.

Citocinina (mg L⁻¹)	Auxina (mg L⁻¹)	
	0	0.025
10	T1	T2
12.5	T3	T4
15	T5	T6
17.5	T7	T8

La altura se evaluó en campana de flujo laminar midiendo la plántula desde la parte basal del tallo hasta la parte apical de la hoja más larga en cm. Se contabilizó el número de hojas emitidas por cada una de las plántulas antes y después de la multiplicación. Para el factor de multiplicación se estableció el número de brotes generadas a partir de una plántula. Después de ocho semanas de cultivo se contabilizaron los brotes y se registró el número de individuos en tf en las diferentes fases de crecimiento determinando el factor de multiplicación.

VI.7 Enraizamiento

En esta fase se seleccionaron las plántulas con mayor crecimiento con tallo definido y al menos cuatro hojas. Se transfirieron a medio de cultivo MS sin citocininas y suplementado con dos auxinas, ácido indolbutírico (IBA) y ácido naftalenácetico (ANA) a dos concentraciones (Cuadro 3); además se tomó como testigo medio MS sin fitoreguladores, para promover el desarrollo de raíces. Se incubaron por 6 semanas en un cuarto de cultivo a condiciones controladas de temperatura, luz y humedad.

Cuadro 3: Tratamientos en la fase de enraizamiento.

Auxina	Concentración (mg L ⁻¹)	
	0.025	0.05
IBA	T1	T2
ANA	T3	T4
Sin auxinas	T5	

VI.8 Establecimiento *ex vitro*

VI.8.1 Aclimatación

Las plantas enraizadas en la fase *in vitro* se caracterizaron en el número y longitud de raíces antes de ser transferidas a sustrato. Se retiraron los residuos de medio con enjuagues suaves con agua, procurando no dañar el sistema radicular y se sumergieron en una solución con fungicida de contacto Captan® 50 (N-(triclorometiltio) ciclohex-4 en -1,2- dicarboxilamida) a una concentración de 2.5 g L⁻¹ para protegerlas de ataques por patógenos. Se solarizó tierra nativa por dos semanas y posteriormente se procedió a preparar mezclas de suelo y turba (30:70).

Se transfirieron las plantas cuidadosamente a macetas de plástico de 13 x 6 cm y se mantuvieron en cuarto de cultivo a condiciones controladas de luz y temperatura (27 ± 2 °C) y riego semanal de 50 ml por maceta por cinco semanas y posteriormente se transfirieron a invernadero con riego por aspersión tres veces por día, con una humedad relativa de 45%, temperatura media diaria de 25 ± 2 °C y humedad del suelo del 61%, durante seis semanas. Se evaluó el porcentaje de sobrevivencia, el cual se obtuvo contabilizando el número de plantas vivas al inicio y final de esta fase.

VI.9 Análisis Estadístico

En la etapa de inducción de brotes se analizaron los datos por medio de estadística descriptiva, registrando medias y desviación estándar del número y tamaño de brote. En fase de multiplicación se realizó un análisis de varianza a un nivel de confianza del 95%, en un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x2, siendo el factor A la citocinina con cuatro niveles de concentración y Factor B, auxina a dos niveles de concentración. Las variables respuesta a considerar fueron el número de brotes, el tamaño de la plántula y número de hojas emitidas. En caso de existir diferencias entre tratamientos se empleó la prueba de comparación de medias de Duncan con el paquete estadístico NCSS 2007.

Para el enraizamiento se utilizó un diseño completamente al azar y se realizó un ANOVA de una vía, se evaluaron dos diferentes auxinas a dos concentraciones y un testigo sin fitoreguladores. Las variables respuesta a medir fueron número y longitud de raíces producidas por plántula. Las diferencias significativas entre tratamientos se establecieron por comparación de medias de Duncan con el paquete estadístico NCSS 2007. Se determinó el índice de supervivencia de los tratamientos en el enraizamiento *in vitro* en cuarto de cultivo a condiciones controladas. Las variables fueron porcentaje de plantas vivas, crecimiento activo y la vigorosidad; éstas dos últimas se evaluaron cualitativamente mientras que para el porcentaje de supervivencia se aplicó estadística descriptiva.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.1 Inducción

Se indujeron en total 19 plantas en tres períodos (Cuadro 4) bajo las mismas condiciones. La evaluación de la respuesta del explante al método de desinfección y a las concentraciones de fitoreguladores suplementados en el medio se realizó semanalmente.

Cuadro 4. Plantas procesadas en la fase de inducción

Inducciones	Plantas (n[*])
Primera	4
Segunda	5
Tercera	10
Total	19

*n= número de plantas procesadas por inducción

El método de desinfección del tejido resultó eficiente al permitir más del 90% de explantes libres de contaminación en el total de las inducciones realizadas (Figura 5). Cuando hubo contaminación se observó una bacteria de color blanco con textura cremosa, proveniente del tejido vegetal (Figura 6). La respuesta del explante de *A. parviflora* a las concentraciones de auxina y citocinina suplementadas al medio se observó desde la primera semana de incubación, al presentar coloración superficial verdosa. Después de la segunda semana se observaron brotes que se diferenciaron a hojas y posteriormente, a partir de la quinta semana se registraron en la superficie de los explantes brotes con características de plántulas de agave (Figura 7), coincidiendo con el

tiempo reportado para otras especies propagadas *in vitro* mediante organogénesis directa (Robert *et al.*, 2004; Caraballo *et al.*, 2006; Salazar *et al.*, 2009).

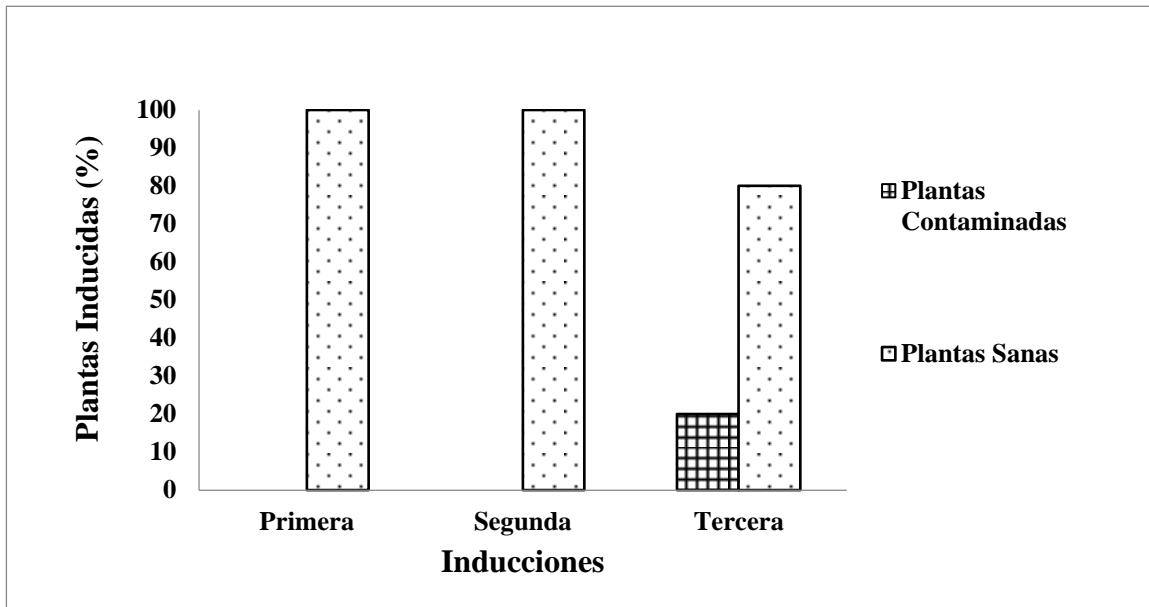


Figura 5. Porcentaje de contaminación de plantas inducidas.



Figura 6. Contaminación por bacteria en los explantes inducidos.

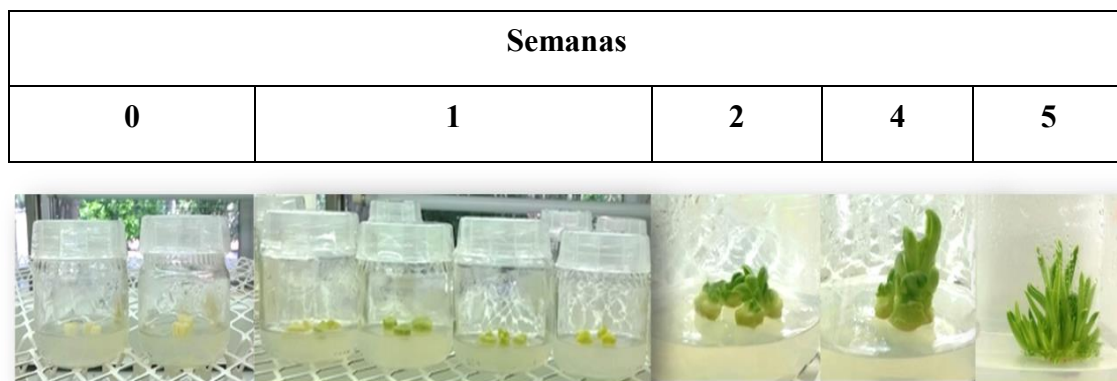


Figura 7. Respuesta cualitativa por semana de los explantes inducidos.

En la clasificación de brotes después de cinco semanas se observaron dos tallas; pequeño (C1) y medio (C2), encontrándose un número de brotes C1 y C2 igual a 179 y 36 respectivamente, en un total de 17 explantes (Cuadro 5). Este resultado se debió al tiempo de evaluación. A partir de la octava semana se observaron plántulas con mayor tamaño. Aun cuando *A. parviflora* es la especie más pequeña del género, se observaron brotes con tallas reportadas como tipo C3 en *A. tequilana*, *A. fourcroydes*, *A. inaequidens* y *A. americana* (Robert *et al.*, 2004; Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008; Luna *et al.*, 2014).

Cuadro 5. Clasificación y número de brotes producidos en cada inducción

Inducción	C1 ^{**}	C2 ^{***}
Primera n=4[*]	30	24
Segunda n=5	39	5
Tercera n=8	110	7

* número de explantes, ** brotes de 0.5-1.0 cm, *** brotes de 1.1-3.0 cm.

El promedio de brotes por explante en las tres inducciones fue de 12.6 ± 6.1 (Cuadro 6). Resultados similares fueron reportados por Rosales *et al.* (2008b), en un estudio realizado en *A. cupreata* con 10.5 brotes por explante y superiores a Salazar *et al.* (2009) en *A. cocui* Trelease, con seis brotes por explante. Ambos emplearon la misma vía de regeneración y fitoreguladores.

Cuadro 6. Promedio de brotes por explante en cada inducción.

Inducción	Total de Brotes	Promedio de Brotes/explante
Primera n=4*	54	13.5
Segunda n=5	44	8.8
Tercera n=8	117	14.6

n=número de explantes

VII.2 Factor de Multiplicación

Después del conteo de los brotes en fase de multiplicación los brotes con crecimiento C2 fueron transferidos a medio MS modificado con 10 mg L^{-1} de BAP y 0.025 mg L^{-1} de 2,4 D por ocho semanas para la generación de biomasa para los posteriores experimentos. Se consideraron 10 líneas clonales activas, a las que se les calculó el factor de multiplicación (FM) establecido entre la fase de inducción y la primera transferencia para la proliferación de nuevos brotes a las mismas concentraciones de fitoreguladores (Cuadro 7). Los resultados variaron dependiendo de la línea, resultando seis con alto FM encontrándose en un rango de 8 a 10 nuevas plantas entre estas dos fases. La variación de los resultados entre líneas clonales se adjudica a que la selección de plantas al momento de la colecta del material fue al azar. Robert *et al.*, (2004) propone que la selección de plantas “elite” debe basarse en el rendimiento de éstas en campo; sin embargo, debido al estatus de la especie solo se consideraron plantas con apariencia sana y sin presencia de inflorescencia para realizar este estudio.

Cuadro 7. Promedio de nuevas plantas entre la inducción y primera multiplicación.

Línea clonal	FM
G4P1	2.73
G1P1	3.57
G3P9	3.7
G3P3	4.13
G2P2	8.26
G3P10	8.33
G3P11	8.33
G3P6	10
G3P4	10
G2P4	10.46

VII.3 Multiplicación

Se realizó un estudio preliminar con ocho tratamientos (Cuadro 8) por triplicado para evaluar cualitativamente la sensibilidad de los brotes obtenidos en inducción, a las diferentes concentraciones de auxina y citocinina, la respuesta fue nula con ausencia de fitoreguladores, mientras que en los tratamientos sin citocinina sólo se observó el crecimiento del brote. Se presentó hiperhidratación en los brotes sometidos a concentraciones de 5 y 10 mg L⁻¹ de citocinina. Este fenómeno es considerado un desorden fisiológico del cultivo *in vitro* relacionado con el potencial hídrico en el medio y la absorción del agua por el cultivo, así como a la utilización de altas concentraciones de citocinina y la presencia de algunos nutrientes en el medio de cultivo (Castro-Concha *et al.*, 1990; Brand, 1993; Caraballo *et al.*, 2006).

En la presente investigación no se puede adjudicar a las concentraciones de macro y micro nutrientes, ni al agente gelificante añadidos al medio de cultivo utilizado ya que todos fueron preparados bajo la misma formulación; sin embargo, sí a las concentraciones de BAP utilizada en los diferentes tratamientos. En un estudio realizado

en *Agave fourcroydes* se observó una tendencia similar al obtener brotes hiperhídricos a concentraciones de 10 mg L⁻¹ de BAP en combinación con 0.025 mg L⁻¹ de 2,4-D (Caraballo *et al.* 2010), a pesar de lo reportado resulta interesante evaluar concentraciones arriba de las consideradas en éste estudio ya que la mejor respuesta en cuanto a la formación de brotes se observó en los tratamientos con mayor concentración de BAP.

Cuadro 8. Sensibilidad de los brotes a diferentes concentraciones de fitoreguladores.

Citocinina (mg L⁻¹)	Auxina (mg L⁻¹)	
	0	0.025
0	S/R	C/B
5	F/B y H	H
10	H	C/B
15	F/B	F/B

S/R= Sin respuesta, C/B= Crecimiento del brote, H= Hiperhidratación, F/B= Formación de brotes.

Se establecieron tratamientos para la multiplicación a las concentraciones de BAP de 10, 12.5, 15, 17.5 mg L⁻¹ en combinación con auxina y en ausencia de esta, las plántulas utilizadas midieron 2.9±0.7 cm con 4.5±1.6 hojas. Se observó un efecto en todas las concentraciones evaluadas con y sin auxina con un promedio de 18 a 24 brotes por planta, sin significancia estadística en la interacción auxina:citocinina. Existió diferencias significativas sólo en el factor citocinina (P<0.05), con una mayor producción de brotes en el tratamiento con 15 mg L⁻¹ de BAP (Figura 8).

El número de brotes a esta concentración fue de 24. Este valor representa la mejor eficiencia en este protocolo, similar con *A. salmiana*, *A. victoriae-reginae* T. Moore y *A. americana* L. con un promedio de 20, 21.3 y 21 brotes por explante, respectivamente (Silos-Espino *et al.*, 2010; Pérez-MolpheBalch *et al.*, 2012; Luna *et al.*,

2014). Aunque Robert *et al.* (1992), proponen que un balance adecuado entre auxina:citocinina permitirá un coeficiente de multiplicación aceptable, en algunos protocolos de agave como *A. parrasana* A. Berger (Santacruz-Rubalcaba *et al.*, 1999), se logró un buen coeficiente de multiplicación (22 ± 6.1 brotes), suprimiendo el uso de auxina, coincidiendo con *A. parviflora*.

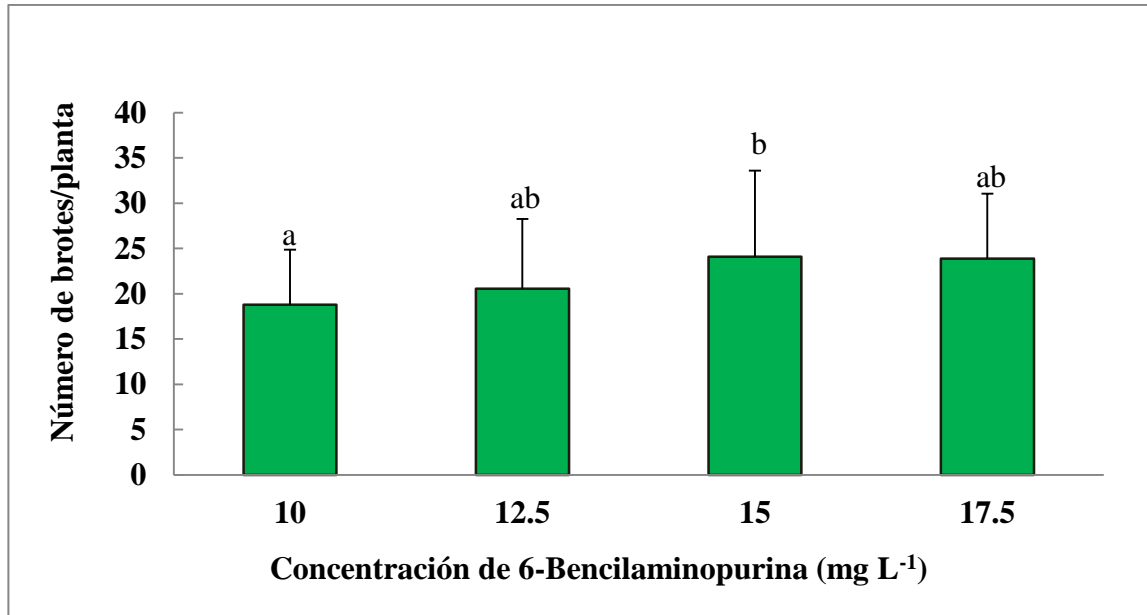


Figura 8. Efecto de la concentración de BAP en la producción de brotes por planta. Letras diferentes indican diferencias significativa utilizando Duncan ($P < 0.05$), ($n = 40$ por tratamiento)

VII.4 Enraizamiento

En la fase de enraizamiento se utilizaron plántulas de 5.2 ± 1.3 cm y 3.9 ± 0.8 hojas. El efecto de los tratamientos se pudo observar a partir de la segunda y tercera semana de evaluación con el desarrollo de las primeras raíces. El porcentaje más alto de plantas enraizadas fue del 76% en el tratamiento sin fitoreguladores. En los tratamientos con auxina a 0.5 mg L^{-1} se observaron bajos porcentajes de enraizamiento a las cinco semanas de evaluación (Cuadro 9), lo cual podría deberse a las altas concentraciones de

citocinina en los tratamientos de multiplicación, concentraciones endógenas elevadas de BAP como lo reportan Caraballo *et al.* (2006) y Azcón-Bieto y Talón (2000).

Cuadro 9. Porcentaje de plantas enraizadas por tratamiento

Auxina	Concentración (mg L⁻¹)	Plantas enraizadas (%)
IBA	0.25	60
	0.5	60
ANA	0.25	40
	0.5	26
TESTIGO	0	76

n=50 plantas por tratamiento.

La longitud de raíces resultó mayor ($P < 0.05$) en las plántulas en el tratamiento sin fitoreguladores, siendo de 3.04 ± 1.48 (Cuadro 10). Estos resultados difieren a lo encontrado en *Agave fourcroydes* por Caraballo *et al.* (2010), obteniendo raíces con mayor longitud a una concentración de 0.5 mg L^{-1} de auxina y un promedio de 11.55 raíces por planta; además logró un 100% de plantas enraizadas. El número de raíces por plántula resultó igual ($P > 0.05$) en los tratamientos con IBA y ANA observándose en promedio 5.2 ± 3.03 siendo estadísticamente diferente al testigo con 2.5 ± 1.3 raíces. Resultados similares se reportaron en vitroplántulas de *A. angustifolia* (Enríquez-del Valle, 2005) enraizados en medio MS sin fitoreguladores, obteniéndose aproximadamente cuatro raíces por planta.

En el presente estudio, aunque se obtuvo un mayor número de raíces en los tratamientos con auxina, éstas observaron una apariencia atípica consistente en estructuras globulares y sin turgencia mientras que en el tratamiento testigo se observó el desarrollo de raíces con apariencia típica (Figura 9).

Cuadro 10. Efecto de la utilización de auxinas en la longitud y número de raíces

Auxina	Concentración (mg L⁻¹)	Longitud de raíces (cm)	Número de raíces/planta
IBA	0.25	1.92±0.86 c*	3.83±2.00 b
	0.5	1.33±0.58 b	4.40 ±3.39 b
ANA	0.25	1.26±0.58 b	5.26±3.03 b
	0.5	0.95±0.34 a	4.57±3.17 b
TESTIGO	0	3.04±1.48 d	2.55 ±1.30 a

*Letras diferentes indican diferencias significativa, utilizando Duncan (P<0.05). n=50 plantas por tratamiento.



Figura 9. Efecto del uso de auxinas vs. un tratamiento sin fitoreguladores (testigo) en la producción de raíces *in vitro*.

VII.6 Aclimatación

En la caracterización de las plantas antes de la aclimatación se registró 8.39 ± 2.53 cm en la talla de las plántulas y 3.8 ± 0.7 hojas. En la primera semana de evaluación las plantas se observó apariencia vigorosa en todas las plantas. A la segunda semana se observó un ligero marchitamiento causado por el estrés al cambio en las condiciones del microambiente artificial creado en las magentas y cuartos de cultivo *in vitro* en las cuales a la planta se le proveía continuamente los nutrientes necesarios para su desarrollo y el cambio repentino ocasiona el estrés observado en las hojas de éstas.

Este efecto se ha considerado como una respuesta normal durante esta fase, debido a las anomalías estomáticas que presentan las plantas cultivadas *in vitro* tales como cambios en la forma, el tamaño, la densidad y su función, además de ausencia de ceras epicuticulares (Monja-Mio *et al.*, 2015) que puedan proteger a las hojas de la planta de las pérdidas de humedad. Por lo que se recomienda se realice la aclimatación en condiciones de humedad relativa tales que puedan evitar lo más posible el marchitamiento (Santíz *et al.*, 2012). A la tercera semana este fenómeno se hizo más evidente al reportarse una reducción del 23.9% en la talla promedio, siendo 6.4 ± 2.4 cm (Figura 10), sin embargo, pese a ello, el crecimiento fue activo con emergencia de hojas nuevas.



Figura 10. Evolución de las plantas en preadaptación por cuatro semanas a condiciones de cuarto de cultivo. a) 0, b) 1, c) 2, d) 3 y e) 4.

La sobrevivencia en la preadaptación en cuartos de cultivo a condiciones controladas después de cinco semanas resultó mayor en las vitroplantas enraizadas con IBA de 97% (Cuadro 11) similar a lo reportado por Aureoles *et al.* (2008) y Robert *et al.* (1987) en el que reportan que la sobrevivencia de plantas de tamaño superior a 4 cm y con más de dos raíces es del 97 al 100 %.

Este resultado demuestra que a pesar de que las raíces no tenían apariencia típica, son funcionales y suficientes al permitir la sobrevivencia de las plántulas en sustrato, no así en las plántulas enraizadas con ANA. En las plántulas enraizadas sin fitoreguladores la supervivencia fue de 80%, similar a lo reportado por Das (1992) en *A. sisalana* Perrine, con un rango de sobrevivencia del 70 al 80 %, porcentaje considerado aceptable y beneficioso al reducir costos y tiempo ante una producción comercial.

Cuadro 11: Porcentaje de sobrevivencia de vitroplantas a la 5^a semana.

Auxina	Concentración (mg L⁻¹)	Sobrevivencia (%)
IBA	0.25	97.1
	0.5	97.5
ANA	0.25	46.6
	0.5	50.4
TESTIGO	0	80.6

VII.7 Recomendaciones

1. No usar en la solución clorada concentraciones mayores a 30% para la desinfección del meristemo apical porque sufre una necrosis irreversible después de la primera semana.
2. Con una hiperhidratación leve a moderada es probable una recuperación, pero si es fuerte los brotes hiperhídricos no se recuperan aún subcultivándose en medio MS a la misma concentración del gelificante.
3. Debido a que los brotes en la multiplicación crecen en forma de racimos pequeños, es necesario separarlos a las cuatro semanas o morirá la planta nodriza y posteriormente, todos los brotes.
4. Es importante que las vitroplantas a enraizar tengan al menos ocho semanas de cultivo para que emitan raíces a partir de la segunda semana de inducir el enraizamiento.

VIII. CONCLUSIONES

Las concentraciones de citocinina y auxina se establecieron para la propagación *in vitro* de *Agave parviflora* Torr., a partir del meristemo del pseudotallo por organogénesis directa. El protocolo permitió la regeneración de plantas completas con apariencia normal en ocho semanas.

Las concentraciones óptimas para la multiplicación *in vitro* fue en medio Murashige y Skoog (MS) modificado con bencilaminopurina sin auxinas. La inducción de raíces *in vitro* resultó mejor en medio MS desprovisto de reguladores de crecimiento y la sobrevivencia de las plántulas en aclimatación fue del 97%.

REFERENCIAS

- Ahumada-Santos, Y. P., J. Montes-Avila, M. J. Uribe-Beltrán, S. P. Díaz-Camacho, G. López-Angulo, R. Vega-Aviña, J. Á. López-Valenzuela, J. B. Heredia y F. Delgado-Vargas (2013). "Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activities of six Agave species from Sinaloa, Mexico." *Industrial Crops and Products* 49(0): 143-149.
- Ángeles-Espino, A., A. J. Valencia-Botín, G. Virgen-Calleros, C. Ramírez-Serrano y L. Paredes-Gutiérrez (2013). "Determinación de la dosis letal (DL50) con Co60 en vitroplántulas de *Agave tequilana* var. Azul." *Revista Fitotecnia Mexicana* 36(4): 381-386.
- Angeles-Espino, A., A. J. Valencia-Botín, G. Virgen-Calleros, C. Ramírez-Serrano, L. Paredes-Gutiérrez y S. Hurtado-De La Peña (2012). "Micropropagation of agave (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) through axillary buds." *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15(3): 693-698.
- Arzate-Fernández, A. M. y R. Mejía-Franco (2011). "Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw." *Revista Fitotecnia Mexicana* 34(2): 101-106.
- Arizona Rare Plant Committee. (2000) Arizona Rare Plant Field Guide. Ed. U.S. Government Printing Office. URL: www.aznps.com/rareplants.php. Accessed: 18 aug 2016.
- Aureoles-Rodríguez, F., J. P. Legaria-Solano, J. Sahagún-Castellanos y M. G Peña-Ortega,. (2008). "Propagación *in vitro* del Maguey bruto (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico". *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 14(3): 263-269.
- Azcón-Bieto, J. y M. Talón, (2000). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ed. McGrawHill

- Blunden, G., Y. Yi y K. Jewers (1973). "The comparative leaf anatomy of *Agave*, *Beschorneria*, *Doryanthes* and *Furcraea* species (*Agavaceae: Agaveae*)." *Botanical Journal of the Linnean Society* 66(2): 157-179.
- Brand, M. H. (1993). "Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 35(3): 203-209.
- Caraballo, M. G., G. G. Oramas, S. A. García, E. A. Cruz, K. Q. Bravo, P. D. Caligari y R. García-González (2010). "Management of Auxin-Cytokinin Interactions to Improve Micropropagation Protocol of Henequen (*Agave fourcroydes* Lem.)." *Chilean Journal of Agricultural Research* 70(4): 545-551.
- Caraballo, M. G., S. A. García y G. G. Oramas, (2006). "Influencia del estado físico del medio de cultivo y diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento sobre la formación de brotes axilares en *Agave fourcroydes* Lem." *Biotecnología Vegetal*. Vol. 6, No. 1: 3-7.
- Castro-Concha, L, V. M. Loyola-Vargas, J. L. Chan y M. L. Robert (1990) "Glutamate deshidrogenasa activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 22: 147-151
- Colunga-GarcíaMarín, P., A. Larqué, L. E. Eguiarte y D. Zizumbo-Villarreal (2007). "En lo Ancestral hay Futuro: del tequila, los mezcales y otros *Agaves*." *Centro de Investigación Científica de Yucatán, México*: 395-402.
- CONABIO (2006). *Mezcales y diversidad*. 2da ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la biodiversidad. México.
- Das T (1992) "Micropropagation of *Agave sisalana*." *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 31:253-255.
- Davis, S. C. y S. P. Long (2015). "Sisal/*Agave*." *Industrial Crops*, Springer: 335-349.
- Davis, S. C., F. G. Dohleman y S. P. Long (2011). "The global potential for *Agave* as a biofuel feedstock." *GCB Bioenergy* 3(1): 68-78.
- DOF (2010). Norma oficial Mexicana, NOM-059-SEMARNAT-2010, "Protección Ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo." S. d. M. A. y. R. Naturales. México D.F. 80.

- Eastmond, A., J. Herrera y M. Robert (2000). "Contribución a la biotecnología del henequén." La biotecnología aplicada al henequén: alternativas para el futuro. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), México: 59-71.
- Enríquez-del Valle J. R., G. Carrillo-Castañeda y J. L. Rodríguez-de la O (2005). "Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*." Revista Fitotecnia Mexicana. 28:175-178.
- García-Mendoza, A. J. (2012) "México, país de magueyes". Suplemento Informativo de La Jornada del campo, No. 53, 18 de febrero de 2012.
- García-Mendoza, A. J. (2007). "Los *Agaves* de México." Ciencias (087).
- García Mendoza, A. J. (2003) Ficha técnica de *Agave parviflora*. "Revisión de las *Agavaceae* (*sensu stricto*), *Crassulaceae* y *Liliaceae*." No. W020.
- García-Mendoza, A. J. y R. Galvan V. (1995). "Riqueza de las familias *Agavaceae* y *Nolinaceae* en México." Boletín de la Sociedad Botánica de México 56, 7-24.
- García, M. D., A. M. Quílez, M. T. Sáenz, M. E. Martínez-Domínguez y R. de la Puerta (2000). "Anti-inflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L., species used in the Caribbean traditional medicine." Journal of Ethnopharmacology 71(3): 395-400.
- Gentry, H. S. (1982). "Agaves of Continental North America." Arizona USA, University of Arizona. pp 195-215.
- Hazarika, B. N. (2006). "Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants." Scientia Horticulturae 108(2): 105-120.
- INEGI (2015). Instituto Nacional de Estadística y Geografía (México). Anuario estadístico y geográfico de Sonora.
- Kortet, R. y A. Hedrick (2007). "A behavioural syndrome in the field cricket *Gryllus integer*: intrasexual aggression is correlated with activity in a novel environment." Biological Journal of the Linnean Society 91(3): 475-482.
- Luna, M. E. M., J. R. Enríquez-del Valle, V. A. Velasco-Velasco, Y. Villegas-Aparicio y J. C. Carrillo-Rodríguez, (2014). "Concentración de benciladenina, tipo y dosis de carbohidratos en el medio de cultivo para proliferación de brotes de *Agave americana*." Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. 46(1): 0-0.

- Luna, M. E., J. R. Enríquez-del Valle, V. A. Velasco-Velasco, Y. Villegas-Aparicio, J. C. Carrillo-Rodríguez y G. Rodríguez-Ortíz (2013). “Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de *Agave*.” *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*: 1151-1159.
- Martínez-Salvador M., H. R. Arias y A. O. Rubio (2005). “Population structure of maguey (*Agave Salmiana* ssp. *Crassispina*) in southeast Zacatecas, México.” *Arid Land Research and Management*. 19(2): 101-109.
- Molina-Freaner, F. y T. R. Van Devender (2010). “Diversidad biológica de Sonora.” UNAM-Conabio, México, DF.
- Monja-Mio, K. M., F. B. Pool, G. H. Herrera, M. Esqueda-Valle y M. L. Robert (2015). “Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. ‘Bacanora’ plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process”. *Scientia Horticulturae*, 189, 32-40.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). “A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.” *Physiologia plantarum* 15(3): 473-497.
- Nava-Cruz, N., M. A. Medina-Morales, J. L. Martínez, R. Rodríguez y C. N. Aguilar (2014). “*Agave* biotechnology: an overview.” *Critical reviews in biotechnology*. (0): 1-14.
- Nobel, P. S. (2011). “Sabiduría del desierto, *agaves* y *cactus*: CO₂, agua, cambio climático, Biblioteca Básica de Agricultura.” No. 635.9525 N6S2 2011.
- Núñez-Noriega, L. y V. Salazar-Solano (2009). “La producción y comercialización de bacanora como estrategia de desarrollo regional en la sierra sonorense.” *Estudios sociales (Hermosillo, Son.)* 17: 205-219.
- Pérez-MolpheBalch, E., M. J. Esparza-Araiza y M. E. Pérez-Reyes (2012). “Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. bajo condiciones de crecimiento retardado.” *Revista Fitotecnia Mexicana* 35(4): 279-287.
- Pérez-MolpheBalch, E., M. R. Ramírez-Malagón, H. G. Núñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo. (1999). “Introducción al cultivo de tejidos vegetales.” Universidad Autónoma de Aguascalientes. pp.179.

- Ramírez-Tobías, H. M., C. B. Peña-Valdivia y J. R. Aguirre (2014). “Respuestas bioquímico-fisiológicas de especies de *Agave* a la restricción de humedad.” *Botanical Sciences* 92(1): 131-139.
- Rangel-Landa, S., A. Casas y P. Dávila (2015). “Facilitation of *Agave potatorum*: An ecological approach for assisted population recovery.” *Forest Ecology and Management* 347(0): 57-74.
- Robert, M. L., J. L. Herrera-Herrera, E. Castillo, G. Ojeda y M. A. Herrera-Alamillo (2006). “An efficient method for the micropropagation of *Agave* species.” *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 318: 165-178.
- Robert, M. L., J. Herrera-Herrera, M. Herrera-Alamillo, A. Quijano y U. Balám (2004). “Manual for the *in vitro* culture of *Agaves*.” United Nations Industrial Development Organization. Vienna: Common Fund for Commodities.
- Robert, M. L., J. L. Herrera., J. L. Chan y F. Contreras (1992) “Micropropagation of *Agaves* sp.” *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 19: 306-329.
- Robert M L, J L Herrera, F. Contreras y K N Scorer (1987) “*In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen).” *Plant Cell Tissue Organ. Culture.* 8: 37-48.
- Rodríguez-Beraud, M. M., M. I. Latsague-Vidal, M. A. Chacón-Fuentes y P. K. Astorga-Brevis (2014). “Inducción *in vitro* de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*.” *Bosque (Valdivia)* 35(1): 111-118.
- Rosales, M. S. D., L. M. G. Jiménez, C. R. Gómez, C. Q. Valles, S. D. D. de León, S. J. M. Ordaz y E. P. M. Balch (2008a). “El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*.” *Investigación y Ciencia* 16(41): 53-62.
- Rosales, M. S. D., Á. G. A. Solís, N. L. V. Méndez y E. P. M. Balch (2008b). “Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de *Agaves* mexicanos.” *Revista Fitotecnia Mexicana* 31(4): 317-322.
- Rout, G. R., S. Samantaray y P. Das (2000). “*In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants.” *Biotechnology Advances* 18(2): 91-120.

- Salazar, E. G., P. González y C. Hernandez. (2009). "Multiplicación *in vitro* de *Agave cocui* Trelease a través de yemas auxiliares." *Agronomía tropical*, 59(2), 129-135.
- Santacruz-Rubalcaba, F, H. Gutiérrez-Pulido y B. Rodríguez-Garay (1999). "Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 163-167.
- Santíz, J. A., R. Rincón-Rosales y F. A. Gutiérrez-Miceli (2012). "Propagación *in vitro* de *Agave grijalvensis* B. Ullrich, una especie endémica de Chiapas bajo protección especial." *Gayana Bot. Edición especial No.69* : pp. 23-30.
- Silos-Espino, H., C. L. Tovar-Robles, N. González-Cortés, S. J. Méndez-Gallegos y D. Rossel-Kipping, (2010). "Estudio integral del maguey (*Agave salmiana*): propagación y valor nutricional." *Revista Salud Pública y Nutrición Edición especial No 5, 2011* pp 75-82
- Silva, M. B., M. Kanashiro, A. Y. Ciampi, I. Thompson y A. M. Sebbenn (2008). "Genetic effects of selective logging and pollen gene flow in a low-density population of the dioecious tropical tree *Bagassa guianensis* in the Brazilian Amazon." *Forest Ecology and Management* 255(5): 1548-1558.
- Smith, R. H. (2013). Chapter 12 "*In Vitro* Propagation for Commercial Production of Ornamentals" *Plant Tissue Culture (Third Edition)*. R. H. Smith. San Diego, Academic Press: 127-145.
- Starr, G. y T. R. Van Devender (2011). "*Agave parviflora* subspecies *densiflora*: A newly found treasure from the Sierra Madre in Eastern Sonora, Mexico." *Cactus and Succulent Journal*, 83(5), 224-231.
- Todd, D. L. E., L. J. Zavala, R. Gamiño, F. R. Delgado, I. V. Aguirre, D. J. L. D. Urbano y I. J. M Salas. (2009). "El maravilloso mundo vegetal. Ciencia, conocimiento y tecnología." Monterrey, Nuevo León. No. 14158.
- Trabelsi, E. B., S. Naija, N. Elloumi, Z. Belfeleh, M. Msellem, R. Ghezal y S. Bouzid (2011). "Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *Olea europaea* L. 'Chetoui'." *Acta physiologiae plantarum* 33(2): 319-324.

- Trelease, W. (1894). "*Agave Parviflora* Torrey." Missouri Botanical Garden Annual Report 1894 (Article Type: research-article/Full publication date: 1894): 164-165.
- Valenzuela-Zapata, A. G. (2007). "Las denominaciones de origen Tequila y Mezcal y la biodiversidad en el género *Agave* sp." CUCBA-Universidad de Guadalajara, Departamento de Salud Pública. Vol. 18
- Van Devender, T. R., M. A. Villa-Andrade, M. Reyes-Juárez, G. Luna-Salazar, M. Padrés-Contreras, F. Padrés y P. S. Martin (2013). "Biodiversity and conservation of the Cienega de Saracachi area, Sonora, Mexico." USDA Forest Service Proceedings RMRS-P-67.