



Universidad Autónoma Chapingo

ENSEÑAR LA EXPLOTACIÓN DE LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE

*Departamento de Fitotecnia
Instituto de Horticultura*

**MICROPROPAGACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DEL
'MAGUEY BRUTO' (*Agave inaequidens* Koch).**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

DOCTORA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

FABIOLA AUREOLES RODRÍGUEZ

Chapingo, Estado de México, agosto de 2008.



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



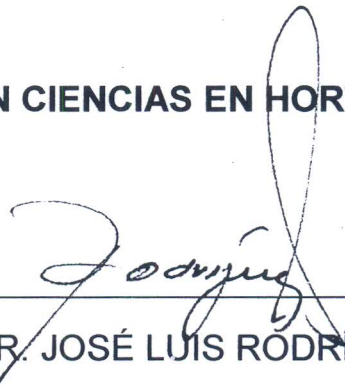
Instituto de Horticultura

**MICROPROPAGACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DEL 'MAGUEY BRUTO' (*Agave inaequidens* Koch).**

Tesis realizada por **Fabiola Aureoles Rodríguez** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



DR. JOSÉ LUIS RODRÍGUEZ DE LA O

ASESOR:



DR. JUAN PORFIRIO LEGARIA SOLANO

ASESOR:



DR. JAIME SAHAGÚN CASTELLANOS

ASESOR:



DRA. MARGARITA GISELA PEÑA ORTEGA

LECTOR
EXTERNO:



DR. JOSÉ GUADALUPE ÁLVAREZ MOCTEZUMA

DEDICATORIA

Con inmenso amor a mi esposo **Alberto Coronado Báez**, a mis hijos **América Paulina e Iván Alberto** y a mis padres **Yolanda Rodríguez León y Saúl Aureoles Pérez**.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** que a manos llenas me da todo y hace todo posible.

A **CONACYT** por el apoyo financiero otorgado para realizar mis estudios.

A la **Universidad Autónoma Chapingo** por abrirme sus puertas.

A cada uno de mis asesores por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo, en especial al **Dr. José Luis Rodríguez de la O** y al **Dr. Juan Porfirio Legaria Solano** porque prácticamente se sentaron a trabajar conmigo y se mantuvieron al corriente de todos mis avances.

Al **Sr. Gustavo Fragoso Cibrian** de la comunidad de Santiago de Pinos municipio de San Sebastián del Oeste Jalisco por facilitar el material vegetal de *A. inaequidens* Koch y *A. maximiliana* Baker.

A la **Biol. Lilián López Chávez** por colaborar en la identificación de las especies y por proporcionar el material vegetal de *A. cupreata* Trel. & Berger.

A la **Ing. Norma Aguilar** por la excelente capacitación para trabajar en el laboratorio de Cultivo de Tejidos.

A la **M. C. Marisa** y al **Q.F.B. Ricardo** por despejarme muchas dudas.

A **mis compañeros de doctorado** por compartir los mismos objetivos y metas, por proporcionarme grandes enseñanzas, por ser mis amigos y sobre todo por permitirme ser parte de un gran equipo.

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora del presente trabajo nació el 24 de enero de 1971 en México, D.F. Realizó estudios de licenciatura en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en el periodo de 1990-1994, donde escribió la tesis denominada "El retardador de crecimiento Paclobutrazol en Aster (*Callistephus chinensis* L.)" y obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo en Horticultura. En el periodo de 1995-1996 trabajó en la producción de nochebuena y otras plantas en maceta en Xochimilco, D.F. En 1997 ingresó nuevamente a la UAAAN a realizar estudios de maestría donde escribió la tesis denominada "Uso de Aminoetoxivimylglicine (AVG) en la preservación de la vida en florero de rosa de corte (*Rosa sp.*)" y obtuvo el grado de Maestro en Ciencias en Horticultura con carta de felicitación. En el año 2000 se desempeñó como maestra en el Instituto de Ciencia y Cultura A.C y en el Centro de Diseño y Comunicación Visual A.C. en la ciudad de Saltillo, Coah. En 2003-2004 se dedicó a la comercialización de flores y arreglos florales en esta misma ciudad. En el año 2004 ingresó al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, donde realizó estudios de Doctorado en Horticultura.

**MICROPROPAGACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL
'MAGUEY BRUTO'
(*Agave inaequidens* Koch)**

**Fabiola Aureoles Rodríguez¹, José Luis
Rodríguez de la O².**

RESÚMEN

El 'Maguey bruto' (*A. inaequidens* Koch) es una especie silvestre que se encuentra amenazada y poco estudiada, y que se utiliza para elaborar la bebida alcohólica "raicilla". Con el fin de establecer las condiciones *in vitro* que permitieran la obtención, multiplicación, enraizamiento y transferencia a sustrato e invernadero de esta especie, fueron evaluados diferentes tipos de explantes, diferentes tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento, diferentes concentraciones de sales inorgánicas Murashige y Skoog y sulfato de adenina, así como diferentes tamaños de planta y cantidades de raíz. También se realizó una caracterización molecular con los marcadores RAPDs para obtener la huella genética, la variabilidad genética y las relaciones genéticas entre *A. inaequidens* Koch, *A. maximiliana* Baker y *A. cupreata* Treal & Berger. Las secciones de tallo formaron hasta 72 brotes en 8 semanas; la concentración de 3.0 mg·L⁻¹ de 6-benciladenina (BA) originó mayor longitud (6.39 mm) y número de brotes (2.02); las concentraciones de BA, Kinetina (Kin) y 6-γ,γ-dimetilalilamino purina (2ip) produjeron una amplia variedad de respuestas; las plantas de tamaño grande (3.8 a 6.8 cm) cultivadas en un medio de cultivo con sales MS al 100 % de su concentración y sin reguladores de crecimiento presentaron mayor número y longitud de raíces en menor tiempo; y el 100 % de las plantas de longitud mayor a 2.5 cm con 2 raíces sobrevivieron a la transferencia a sustrato e invernadero. En la caracterización molecular se obtuvo la huella genética, la variabilidad genética y las relaciones genéticas de las especies estudiadas. Se encontró baja variabilidad con un polimorfismo del 50.82 % y la mayor cercanía genética entre especies se observó entre *A. maximiliana* Baker y *A. cupreata* Treal & Berger.

Palabras clave: Raicilla, Cultivo *in vitro*, Citocininas, RAPD, Variabilidad genética.

¹ Tesista

² Director

**MICROPROPAGATION AND
MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
'MAGUEY BRUTO'
(*Agave inaequidens* Koch)**

**Fabiola Aureoles Rodríguez¹, José Luis
Rodríguez de la O².**

ABSTRACT

"Maguey bruto" (*A. inaequidens* Koch) is one of the wild species than is endangered and has not been much studied. It is used to make the alcoholic beverage called "raicilla". Different kinds of explants, types and concentration of growth regulators, concentrations of Murashige and Skoog inorganic salts, and adenine sulphate, and also plants of different sizes with varied amounts of roots were evaluated to establish the *in vitro* conditions that would permit the obtainment, multiplication, rooting and transferring of this species into substrate under greenhouse conditions. A molecular characterization with RAPDs markers was also made to obtain the genetic fingerprint, variability, and relationship between *A. inaequidens* Koch, *A. maximiliana* Baker and *A. cupreata* Treal & Berger. The stem sections formed as many as 72 shoots in 8 weeks; the concentration of 3.0 mg·L⁻¹ of 6-benzyl adenine (BA) resulted in longer length (6.39 mm) and number of shoots (2.02); the concentrations of BA, Kinetine (Kin) and 6-(γ,γ-dimethylallylamino)-purine (2ip) produced a wide variety of effects; large plants (3.8 a 6.8 cm) cultivated in culture medium with salts at a concentration of 100% and without regulators presented a higher number and length of roots in less time. All (100%) of the plants of more than 2.5 cm in length and 2 roots survived the transference to substrate and greenhouse. Regarding the molecular characterization, the genetic fingerprint, the genetic variability and the relation between *A. inaequidens* Koch, *A. maximiliana* Baker and *A. cupreata* Treal & Berger were obtained. Low genetic variability was found with a polymorphism of 50.82%. The greatest relationship among species occurred between *A. maximiliana* Baker and *A. cupreata* Treal & Berger.

Key words: Raicilla, *In vitro* tissue, Citokins, RAPD, Genetic variability.

¹ Thesis author

² Thesis director

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Origen y distribución de los agaves.....	4
2.2. Descripción botánica y taxonómica de los agaves.....	4
2.2.1. <i>A. inaequidens</i> Koch.....	6
2.3. Importancia mundial, nacional y regional de los agaves.....	8
2.3.1. Importancia de <i>A. inaequidens</i> Koch.....	8
2.4. Reproducción y formas de multiplicación de los agaves.....	9
2.4.1. Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	10
2.4.2. Uso de cultivo de tejidos en la micropropagación de agave.....	17
2.5. Constitución genética de los agaves.....	19
2.6. Caracterización molecular.....	20
2.6.1. Caracterización molecular en agaves.....	22
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1. Ubicación de la investigación.....	24
3.2. Colecta del material vegetal.....	24
3.3. Realización de la investigación.....	25
3.3.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. inaequidens</i> Koch.....	25
3.3.1.1. Establecimiento.....	25
3.3.1.2. Multiplicación.....	26
3.3.1.3. Enraizamiento.....	32
3.3.1.4. Transferencia a sustrato e invernadero.....	34
3.3.2. Escalamiento de multiplicación <i>in vitro</i>	34
3.3.3. Caracterización molecular.....	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40

4.1. Cultivo <i>in vitro</i>	40
4.1.1. Establecimiento.....	40
4.1.2. Multiplicación.....	42
4.1.2.1. Experimento 1.....	42
4.1.2.2. Experimento 2.....	44
4.1.2.3. Experimento 3.....	49
4.1.3. Enraizamiento.....	52
4.1.4. Transferencia a sustrato e invernadero.....	55
4.2. Escalamiento de multiplicación <i>in vitro</i>	56
4.3. Caracterización molecular.....	58
4.2.1. Análisis de RAPDs.....	58
4.2.2. Agrupamiento.....	62
4.2.3. Análisis de Poblaciones.....	66
V. CONCLUSIONES	69
VI. LITERATURA CITADA	70
VII. ANEXOS	77
ANEXO A. Composición de las vitaminas WS modificadas por Lozoya y Aguilar (Aguilar, 1997).....	77
ANEXO B. Formulas utilizadas para realizar la prueba de comparación de dos proporciones de muestras independientes.....	78
ANEXO C. Composición de las vitaminas WS Wetmore and Sorokin (1955).....	79

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
CUADRO 1. Concentración de tres tipos de reguladores de crecimiento utilizados en la multiplicación de <i>A. inaequidens</i> Koch.....	28
CUADRO 2. Concentraciones del regulador benciladenina (BA) y el compuesto sulfato de adenina (SA) utilizadas para promover el crecimiento y diferenciación de estructuras globulares en <i>A. inaequidens</i> Koch.....	30
CUADRO 3. Tratamientos probados para promover la formación de raíz en plantas de <i>Agave inaequidens</i> Koch.....	33
CUADRO 4. Reactivos utilizados en la mezcla para realizar PCR y obtención de los patrones RAPDs.....	36
CUADRO 5. Secuencia de los iniciadores utilizados para obtener los patrones RAPD.....	37
CUADRO 6. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística de las variables de crecimiento y vigor de <i>A. inaequidens</i> Koch seis semanas después de la siembra en medios de cultivo con cinco concentraciones de BA.....	42
CUADRO 7. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística de las variables de crecimiento de <i>A. inaequidens</i> Koch nueve semanas después de la siembra en medios de cultivo con tres reguladores de crecimiento y dos concentraciones.....	46
CUADRO 8. Comparaciones de dos proporciones para las variables formación de estructura globular y raíz en <i>A. inaequidens</i> Koch, nueve semanas después de la siembra en medios de cultivo con tres reguladores de crecimiento y dos concentraciones.....	48
CUADRO 9. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística de variables de crecimiento y vigor en <i>A. inaequidens</i> Koch, doce semanas después de la siembra en medios de cultivo con diferentes concentraciones de BA y SA.....	51
CUADRO 10. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística para las variables de crecimiento de raíz de <i>A. inaequidens</i> Koch seis semanas después de la siembra de tres tamaños de planta en tres medios de cultivo.....	53

CUADRO 11.	Listado de iniciadores y sus secuencias, total de bandas amplificadas, polimorfismo detectado por especie y polimorfismo total presente en tres especies de agave.....	59
CUADRO 11.	Diversidad genética dentro y entre poblaciones de tres especies de agave.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
FIGURA 1. Mapa de distribución de <i>A. cupreata</i> Trel. & Berger; <i>A. hookeri</i> Jacob, <i>A. inaequidens</i> Koch, <i>A. maximiliana</i> Baker, y <i>A. maximiliana</i> , var. <i>katharinae</i> en México.....	5
FIGURA 2. a) Imagen de una planta adulta de <i>A. inaequidens</i> Koch en campo, b) forma de la espina de la hoja (arriba) y dientes dimórficos en el margen de la hoja (abajo).....	7
FIGURA 3. Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>A. inaequidens</i> Koch. a) plantas madre, b) secciones de tallo <i>in vitro</i> (1ª semana), c) inicio de la brotación (4ª semana), d) 78 brotes bien diferenciados (8ª semana).....	41
FIGURA 4. Desarrollo individual de <i>A. inaequidens</i> Koch utilizando cinco diferentes concentraciones de BA. a) brotes adventicios formados en una sección de tallo, b) separación de brotes, c) respuesta con la aplicación de diferentes concentraciones de BA.....	43
FIGURA 5. Desarrollo en plantas de <i>A. inaequidens</i> Koch. a) siembra de planta con poda de hojas, b) plantas con 3.0 mg·L ⁻¹ de Kin en el medio de cultivo y c) tejido en forma de estructura globular.....	47
FIGURA 6. a) siembra de estructura globular (semana 1), b) estructura globular en un medio de cultivo 160 mg·L ⁻¹ de SA y sin BA (semana 12), c) estructura globular diferenciada en brotes en un medio de cultivo con 1.0 mg·L ⁻¹ de BA y sin SA (semana 8), d) estructura globular en un medio de cultivo con 1.0 mg·L ⁻¹ de BA y sin SA que muestra brotes totalmente diferenciados, brotes en formación y presencia de tejido globular (semana 12).....	51
FIGURA 7. Número de raíces formadas <i>in vitro</i> en plantas de <i>A. inaequidens</i> Koch al utilizar tres medios de cultivo y tres tamaños de planta.....	54
FIGURA 8. Longitud de raíces formadas <i>in vitro</i> en plantas de <i>A. inaequidens</i> Koch al utilizar tres medios de cultivo y tres tamaños de planta.....	54
FIGURA 9. Formación de raíz con 3 medios de cultivo y tres tamaños de plantas. a) medio con sales MS al 100 % de su concentración y sin regulador, b) medio con sales MS al 50% de su concentración y sin regulador c) medio con sales MS al 100% + 3.0 mg·L ⁻¹ de 2ip.....	55

FIGURA 10.	Transferencia de plantas de <i>A. inaequidens</i> cultivadas in Vitro a sustrato e invernadero. a) aclimatación de plantas, b) plantas a los 6 meses de transferencia a sustrato e invernadero.....	56
FIGURA 11.	Patrones de bandeo RAPDs obtenidos con los iniciadores a) B01 y b) B06. B=blanco.....	61
FIGURA 12.	Dendrograma construido usando el coeficiente de similitud de Jaccard con los patrones de bandas RAPDs de las especies <i>A. inaequidens</i> Koch, <i>A. maximiliana</i> Baker y <i>A. cupreata</i> Trel & Berger.....	63
FIGURA 13.	Dendrograma construido a partir de 1000 combinaciones de remuestreo obtenido mediante el coeficiente de Jaccard de los productos RAPDs de genotipos pertenecientes a tres especies de agave. Los números en las ramas indican el número de veces en porcentaje en que la topología de una rama particular se repite.....	64
FIGURA 14.	Dendrograma de relaciones genéticas entre poblaciones de 3 especies de agave, con base en la distancia genética de Nei (1978).....	68

ABREVIATURAS

AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalen acético
BA	Benciladenina o 6-Bencilaminopurina
Kin	Kinetina
MS	Medio de cultivo formulado con sales inorgánicas Murashige y Skoog (1962)
SA	Sulfato de adenina
2,4-D	Ácido 2, 4 diclorofenoxiacético
2ip	2 isopentiladenina

I. INTRODUCCIÓN

México es considerado uno de los centros de origen de los agaves, en donde de 310 especies descritas, se encuentran 272 (Granados, 1993). Por su gran diversidad, éstos se han utilizado en la elaboración de alimentos, fibras, forrajes, medicinas y bebidas alcohólicas como: tequila, mezcal, bacanora, pulque y raicilla. Esta última, es una bebida artesanal originaria del estado de Jalisco que se elabora con tres especies de agave, una de ellas es el 'maguey bruto' (*Agave inaequidens* Koch).

A. inaequidens Koch es una especie silvestre que presenta amenaza de extinción por dos razones. Primero, como la calidad de la raicilla es similar a la del tequila y a la del mezcal, esta especie ha sido objeto de sobreexplotación. Y segundo, este agave presenta problemas en su propagación, porque si bien, es posible su propagación por hijuelos, una planta adulta sólo genera 2 o 3 de ellos al año y en el caso de la propagación por semilla, sólo una de miles llega a estado adulto. Además, una planta para madurar demora entre 8 y 15 años y en ocasiones no llega a esta etapa porque se ve afectada por: plagas y enfermedades, condiciones ambientales adversas, competencia entre sus iguales o por recolectarse antes de tiempo. Por otra parte, como la planta no ha sido domesticada no se tiene conocimiento de sus características genéticas como son una huella genética, variabilidad genética, relaciones genéticas u otra

característica de interés que funjan como herramientas útiles en su identificación y/o mejoramiento genético.

Debido al éxito logrado mediante la micropropagación como estrategia de multiplicación y a la necesidad de estudiar las características genéticas del 'maguey bruto' (*A. inaequidens* Koch), los objetivos de la presente investigación fueron:

- Establecer las condiciones *in vitro* que permitan la obtención, multiplicación, enraizamiento y transferencia a sustrato e invernadero de *A. inaequidens* Koch con la evaluación de diferentes tipos de explantes; diferentes concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento, diferentes concentraciones de sales inorgánicas Murashige y Skoog (MS) y sulfato de adenina; así como diferentes tamaños de planta y cantidades de raíz.
- Establecidas las condiciones *in vitro* en *A. inaequidens* Koch realizar un escalamiento de producción.
- Realizar una caracterización molecular mediante RAPDs para obtener la huella genética, variabilidad y relaciones genéticas en una población de *A. inaequidens* Koch, una de *Agave maximiliana* Baker y una de *Agave cupreata* Trel. & Berger.

Las hipótesis propuestas en esta investigación fueron:

- Con la evaluación de diferentes tipos de explantes; diferentes concentraciones y tipos de reguladores de crecimiento, diferentes concentraciones de sales inorgánicas Murashige y Skoog (MS) y sulfato de adenina; así como diferentes tamaños de planta y cantidades de raíz, podrán establecerse las condiciones *in vitro* que permitan la obtención, multiplicación, enraizamiento y transferencia a sustrato e invernadero del 'maguey bruto' (*A. inaequidens* Koch).
- Con las condiciones definidas para cultivo *in vitro* en *A. inaequidens* Koch se realizará un escalamiento de multiplicación.
- Mediante una caracterización molecular con RAPDs se obtendrá: la huella genética, variabilidad y relaciones genéticas en una población de *A. inaequidens* Koch, una de *Agave maximiliana* Baker y una de *Agave cupreata* Trel. & Berger.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen y distribución de los agaves

Se tiene conocimiento de la presencia de agaves en el Continente Americano desde hace por lo menos 9,000 años, y en la actualidad, se han descrito 310 especies, de las cuales, en México existen 272, por ello se considera a este país como uno de los principales centros de origen de este género (Granados, 1993).

Los agaves se pueden encontrar en cualquier parte de la República Mexicana, sin embargo, muchas especies se localizan en la zona centro y la gran mayoría se encuentran hacia el norte.

La especie *A. inaequidens* Koch crece a una altitud de 1,800 a 2,400 m.s.n.m. y se distribuye en las faldas de las montañas, en las barrancas profundas de la Sierra Madre Occidental, a lo largo del camino entre Durango y Mazatlán y en los estados de Michoacán y México (Figura 1).

2.2. Descripción botánica y taxonómica de los agaves

Los agaves son plantas perennes, monocárpicas, que forman rizomas y presentan tallos acaules, tienen hojas grandes dispuestas en roseta que muestran una textura succulenta, son fibrosas y terminan en espina, los márgenes de las hojas pueden ser lisos o crenados y con pequeñas espinas

(dientes) en forma de gancho o rectas. Cuando los agaves florecen forman escapos largos, semileñosos con inflorescencias del tipo espiga o panoja, las flores son de color amarillo (generalmente) y los frutos son cápsulas dehiscentes, leñosas y alargadas que tienen una apariencia alada (con 3 alas); las semillas son numerosas, aplanadas, algo triangulares y de testa negra.

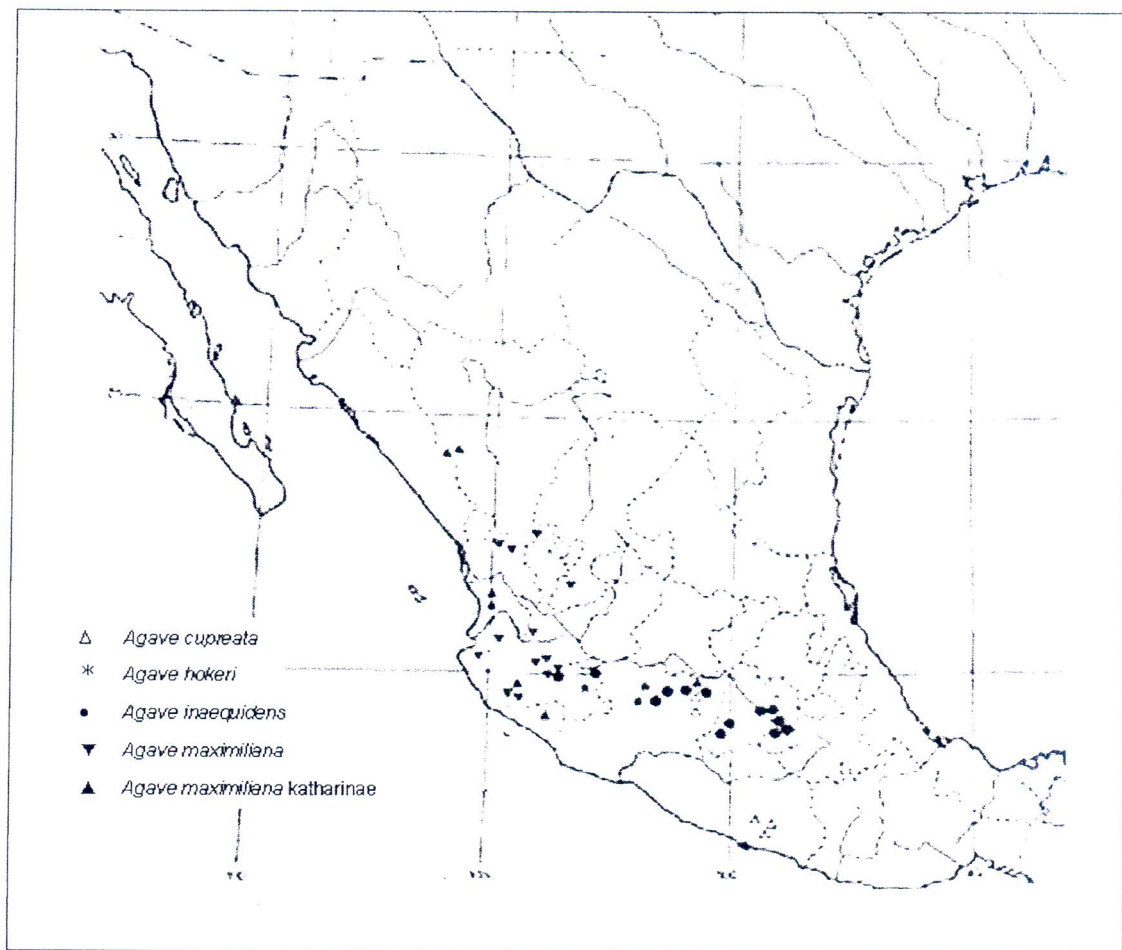


FIGURA 1. Mapa de distribución de *A. cupreata* Trel. & Berger, *A. hookeri* Jacob, *A. inaequidens* Koch, *A. maximiliana* Baker, y *A. maximiliana*, var. *katharinae* en México.

La clasificación de los agaves se ha intentado en diferentes ocasiones y aún no se ha logrado de manera satisfactoria. Estudios citogenéticos, bioquímicos,

morfológicos y evolutivos no han sido suficientes para generar una clasificación adecuada y libre de controversias, no obstante, Cronquist (citado por Granados, 1993) ubica a los agaves en las categorías siguientes:

División: Angiospermae
Clase: Monocotiledoneae
Orden: Liliales
Familia: Agavaceae
Subfamilia: Agavoideae
Tribu: Agaveae
Género: Agave
Subgénero: Agave

Sistemáticamente el subgénero agave comprende 12 grupos, uno de ellos es el Crenatae que incluye 9 especies (*A. bovicornuta* Gentry, *A. caldodonta* Berger, *A. cupreata* Trel. & Berger, *A. hookeri* Jacobi, *A. inaequidens* Koch, *A. jaiboli* Gentry y *A. maximiliana* Baker) que se caracterizan por tener los márgenes de las hojas profundamente crenados-mamilados (de donde proviene el nombre Crenatae).

2.2.1. *A. inaequidens* Koch

Conocido comúnmente como 'maguey bruto' y en ocasiones como 'lechuguilla', es un agave que presenta color de planta verde luminoso a verde amarillento, rara vez glauco; hojas lanceoladas u oblanceoladas largamente acuminadas

con una longitud de 75-150 cm y anchura de 11-21 cm (4-7 veces más largas que anchas) y espinas o dientes dimórficos café oscuro que alcanzan una longitud de 3 a 5 cm, también tienen espinas en los ápices de las hojas que miden de 5-10 cm de longitud (Figura 2). Cuando florecen forman panículas de 5 a 8 m de alto con 30 a 50 umbelas compactas; las yemas y tépalos son morado rojizo, las flores cuando abren muestran un color amarillo y alcanzan una longitud de 60 a 90 mm; los frutos son cápsulas oblongas de 4 a 4.5 cm de longitud y de color café; las semillas son hemisféricas, de color ligeramente oscuro y alcanzan un tamaño de 6-7.5 cm x 4.5-5.5 cm (Gentry, 1992). El nombre 'maguey bruto' se debe a que produce una sustancia llamada sapogenina que causa irritación o comezón en la piel.

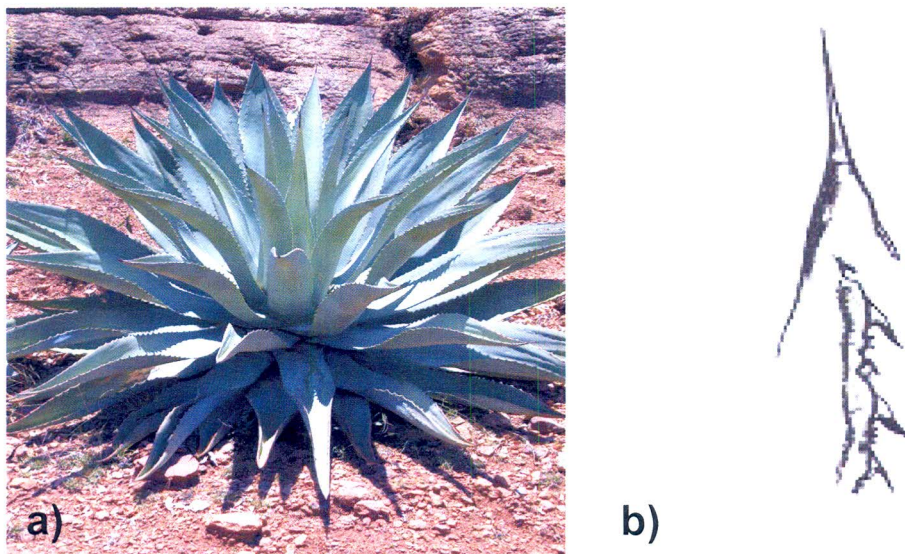


FIGURA 2.- a) Imagen de una planta adulta de *A. inaequidens* Koch en campo, b) forma de la espina de la hoja (arriba) y dientes dimórficos en el margen de la hoja (abajo).

2.3. Importancia mundial, nacional y regional de los agaves

Debido a su gran diversidad, en México los agaves han tenido un sinnúmero de usos, se han empleado en comidas y condimentos; en la elaboración de tejidos y vestuarios; en la construcción; como plantas de ornato, medicinales o forraje; para lindar terrenos; en el uso doméstico en general y en la elaboración de bebidas alcohólicas. En la actualidad, la producción de bebidas alcohólicas como el tequila y el mezcal generan grandes ganancias, esto se debe a que tanto el tequila como el mezcal son productos de mucha demanda y se exportan a más de 50 países. Otras bebidas como el pulque, el aguardiente, la bacanora y la raicilla se producen en menor proporción pero con igual aceptación.

2.3.1. Importancia de *A. inaequidens* Koch

Este agave junto con *A. maximiliana* Baker y en ocasiones *A. hookeri* Jacobi son la materia prima de la bebida alcohólica llamada "Raicilla", ésta se produce desde la época Colonial en la región Oeste del Estado de Jalisco y cuenta con enorme potencial porque su calidad es similar a la del tequila y el mezcal. La producción de raicilla fue hasta el año 2000 una práctica ilegal y por esta razón su producción aún se conserva artesanal y casera. Un estudio estima que se obtienen entre 20 y 25 mil litros al año y en un futuro muy próximo este volumen podría incrementarse notablemente (Anónimo, 2003).

2.4. Reproducción y formas de multiplicación de los agaves

Muchas especies de agave se propagan por semilla, una sola planta de agave puede producir hasta 6,000 semillas en frutos llamados cápsulas, pero muchas de ellas no logran germinar porque tanto los frutos como las semillas son devoradas por roedores, hormigas o mueren por desecación. Si una semilla logra germinar y producir una plántula, ésta tiene poca probabilidad de sobrevivir. Algunos autores calculan que de 500,000 semillas, sólo una sobrevive hasta llega a etapa adulta y reproducirse.

Además de la propagación sexual, los agaves se multiplican vía asexual o vegetativa (hijuelos o bulbillos). Por hijuelos es la forma de multiplicación más común, éstos se forman en la base del tallo como en *A. inaequidens* Koch (Madrigal y Díaz, 1991) o por rizoma y una planta adulta en su vida puede producir en promedio de 7 a 20 hijuelos, dependiendo de las condiciones ambientales donde se desarrolle la planta. Por su parte, los propágulos o bulbillos se forman en la inflorescencia y es la forma de multiplicación menos común por ser un evento que se presenta con poca frecuencia. Una planta multiplicada ya sea por hijuelos o por bulbillos no siempre llega a la etapa adulta; la sequía, plagas y enfermedades o la competencia con otras plantas de su misma especie (por luz, agua y nutrientes) pueden afectar su supervivencia. Además, una planta de agave para llegar a estado adulto demora entre 7 y 25 años. Para el caso de *A. inaequidens* Koch la madurez se alcanza entre 8 y 15 años.

Otra forma de multiplicación es la asistida. Los agaves en particular han tenido gran respuesta al empleo de tecnologías como cultivo de tejidos *in vitro*. Especies como *Agave tequilana* Weber se multiplican por esta vía a escala industrial.

2.4.1. Cultivo de tejidos *in vitro*

El cultivo de tejidos es una tecnología que consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica ápices de raíz y tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen (Street citado por Merino y Hurtado, 1987). Esta tecnología ha permitido multiplicar en masa y rápidamente plántulas que son fenotípicamente uniformes y genéticamente semejantes a la planta madre; además, posibilita la obtención de plantas libres de patógenos, por lo que muchas especies se han multiplicado por esta vía, incluyendo a los agaves.

Algunos autores coinciden en que el cultivo de tejidos debe comprender las etapas siguientes: establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación o transferencia a invernadero. Otros consideran una etapa previa que es la de preparación de los explantes para el establecimiento (etapa 0).

Etapas 1: Establecimiento del cultivo. El objetivo es establecer cultivos viables y asépticos. El éxito está determinado por la edad cronológica de la planta

donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo, el tamaño del explante y el proceso de desinfestación. En esta etapa los principales procesos a controlar son: la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes.

Etapa 2: Multiplicación. Su objetivo es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la etapa siguiente de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). En esta etapa, cualquiera que sea la vía de regeneración empleada, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal. Los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento (auxinas, citocininas y ácido giberélico) y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes. Las vías de regeneración organogénica y embriogénica, pueden darse en forma directa o indirecta (formación de callo).

Etapa 3: Enraizamiento y aclimatación. En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil, mientras que en las especies leñosas es más complicado por su limitada capacidad rizogénica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En este último caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (auxinas) para promover la rizogénesis.

El éxito que se obtenga en un cultivo de tejidos vegetales depende del uso de medios nutritivos adecuados, de la utilización de tejidos viables, de las

condiciones de incubación idóneas y de la buena calidad de reactivos. Usando sustancias químicas adecuadas, ha sido posible establecer cultivos a partir de casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales. Los ingredientes más utilizados en los medios de cultivo pueden contener:

1.- Sales inorgánicas (Mezcla de sales). Con el fin de optimizar medios de cultivo para hacer crecer plantas, se han realizado diversas investigaciones con el fin de encontrar la mezcla más adecuada de sales y la Murashige y Skoog (1962) ha demostrado ser el medio adecuado para el crecimiento de una gran variedad de especies y partes diferentes de las plantas. Esta fórmula contiene grandes cantidades de macronutrientes y altas concentraciones de nitrógeno en forma de NH_4NO_3 y KNO_3 .

2.- Compuestos orgánicos. Se clasifican en tres grupos: carbohidratos, hormonas y vitaminas. Otros compuestos como aminoácidos y/o amidas, purinas y pirimidinas, hexitales y ácidos orgánicos también se utilizan.

Carbohidratos. Como fuente de carbono la sacarosa es la más utilizada en concentraciones de 2 a 3 %. Ocasionalmente se usa glucosa, fructosa y/o almidón.

Reguladores de crecimiento y desarrollo vegetal. Los más utilizados son las auxinas, citocininas y giberelinas, su concentración y tipo de regulador varía en función de la especie pero generalmente las auxinas se usan en una

concentración de 0.1 a 10.0 mg·L⁻¹ y las citocininas de 0.03 a 30.0 mg·L⁻¹ (Hurtado y Merino, 1987). Cada hormona influye en varios procesos del desarrollo, y sus efectos biológicos generalmente resultan de la acción conjunta con otras hormonas (Jankiewicz, 2003).

Las auxinas en las plantas promueven el alargamiento y la división celular, la formación de brotes, raíces y tejido calloso, la respiración, abscisión, partenocarpia, dominancia apical y embriogénesis. El alargamiento y el crecimiento provocado por las auxinas se debe a un incremento en el contenido osmótico de la célula y la permeabilidad al agua, estos fenómenos reducen la presión de la pared, aumentan la síntesis de ARN, proteínas específicas (enzimas) y aún de la misma pared, lo que genera un aumento en la plasticidad de la pared celular y su extensión. Las auxinas también intervienen en la división celular, tanto en plantas completas como en tejidos cultivados (Hurtado y Merino, 1987; Salisbury and Ross, 1994 y Jankiewicz, 2003).

Las citocininas influyen en procesos bioquímicos como la estimulación de la biosíntesis de los ácidos nucleicos y de proteínas, afectan procesos como la germinación de las semillas y tienen una importante función en la morfogénesis debido a que suprimen la dominancia apical y causan la brotación de yemas laterales. También inician la formación de yemas adventicias e inhiben la formación y el crecimiento de las raíces. De las citocininas sintéticas, la BA es la más utilizada por su precio bajo y junto con la Kin muestra alta actividad biológica.

Los efectos de las auxinas están en función de las citocininas y viceversa, además, en forma conjunta estimulan la división y alargamiento celular en plantas e interactúan determinando la ruta que seguirá la diferenciación celular. Hay evidencias de que bajo condiciones *in vitro* la formación de yemas se da gracias a una proporción alta de citocininas con respecto a las auxinas (Hurtado y Merino, 1987; Salisbury y Ross, 1994 y Jankiewicz, 2003).

Las giberelinas presentan un espectro de actividad biológica muy variado, pueden producir elongación extraordinaria del tallo en enanos genéticos, fenómeno que puede ser atribuible a la estimulación de la división y el alargamiento celular; además son responsables de inducir la hidrólisis de las reservas de almidón en el endospermo durante la germinación de las semillas y afectan la expresión sexual de las flores (Hurtado y Merino, 1987; Salisbury y Ross, 1994 y Jankiewicz, 2003).

Vitaminas. La vitamina que ha tenido gran respuesta en el cultivo de tejidos es la tiamina; algunas otras se utilizan debido a que pueden estimular procesos de crecimiento específicos, como el mio-inositol, ácido nicotínico, ácido fólico, riboflavina, ácido pantoténico y piridoxina.

Aminoácidos y amidas. Las que han tenido efectos benéficos son la L-arginina, L-serina, y L-tirosina; está última es crítica en la formación de tallos en cultivo de callos.

Otros compuestos orgánicos. El sulfato de adenina es un estimulante efectivo que favorece la formación de tallos *in vitro*. Los ácidos cítrico y ascórbico se utilizan para evitar la oxidación de inóculos y el ácido málico para el cultivo de embriones.

3.- Complejos naturales. Se utilizan para enriquecer el medio y como último recurso cuando otros compuestos han fallado. Entre ellos se encuentran la pulpa de plátano, endospermo de coco, emulsión de pescado, jugo de naranja, hidrolizado proteico, jugo de tomate y extracto de levadura.

4.- Materiales inertes de soporte. El agar es el medio de soporte más utilizado aunque no es inerte puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibidoras o estimulantes del crecimiento. El papel filtro también sirve de soporte y el carbón en bajas concentraciones ayuda a absorber sustancias que se forman o que se desprenden de los tejidos cultivados (Hurtado y Merino, 1987).

Algunos factores físicos que se deben regular en las cámaras de incubación de cultivos *in vitro* son los siguientes:

1. Temperatura. En los cuartos de incubación de los laboratorios de cultivo de tejidos *in vitro* es común encontrar que se maneja la misma temperatura durante el día y durante la noche, la temperatura que se ha determinado como propicia para el crecimiento *in vitro* se encuentra en los 25 °C (con un rango

entre 17 y 32 °C), sin embargo, múltiples estudios demuestran que los rangos de temperatura que se deben manejar durante el día y la noche varían de acuerdo a: la especie, tipo de explante, medio de cultivo y etapa ontológica; estos estudios confirman que la temperatura es un factor determinante en las respuestas morfogénicas, ejemplo de ello se observó en *Artocarpus heterophyllus* donde se produjeron más yemas axilares cuando se manejó en el cuarto de incubación una temperatura de 25 a 30 °C que cuando se mantuvo una temperatura de 20 °C y escasamente se obtuvo brotación a los 30 °C (Rahman y Blake citado por George, 1993), También en pedúnculos utilizados como explante de *Anemone coronaria* se uso una temperatura de 15 a 19 °C en incubación y se propició la producción de yemas axilares; con temperaturas arriba de los 20 °C muchos explantes murieron (Sutter y Langhns citados por George, 1993).

2. Intensidad lumínica. Este factor es importante en los procesos de: fotosíntesis, fotomorfogénesis (desarrollo de estructura o forma) y fototropismo (orientación del crecimiento). En *Agave parrasana* Berger una intensidad lumínica de $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ en la cámara de incubación produjo un mayor número de raíces y de mayor vigor que las iluminadas con una intensidad de $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; además, la alta intensidad lumínica dio a la plantas una coloración verde azulado (color característico de la especie) (Santacruz *et al.*, 1999).

3. Fotoperiodo. La longitud del día afecta a las plantas de dos formas; primero, regula la cantidad de energía interceptada, es decir, el crecimiento de la planta (fotosintéticamente dependiente) es proporcional a la duración de la exposición a la luz natural o a la luz artificial; segundo, la planta puede sentir y reconocer cambios en el ambiente a través de un mecanismo interno, éste funciona de acuerdo al tiempo de exposición a la luz diurna (fotoperiodo). En cultivo de tejidos el fotoperiodo afecta de forma diferente la respuesta morfogénica de muchos tejidos, en *Camelia japonica* la multiplicación de yemas axilares fue mayor cuando se proporcionó un fotoperiodo de 12 h que con uno de 18 h (Sanmartín citado por George, 1993) y en plántulas de *Dianthus caryophyllus* (Stimart, 1986 citado por George, 1993) expuestas a 12 h de iluminación artificial presentaron floración mientras que con 16 h se mantuvo la condición vegetativa.

2.4.2. Uso de cultivo de tejidos en la micropropagación de agave

Establecimiento. La regeneración *in vitro* de agaves se ha logrado a partir de yemas axilares, rizomas, bulbilos, secciones de tallo (Madrigal *et al.*, 1989) y por semilla (Melda y Ruiz, 2004). En *A. fourcroydes* Lem. (henequén) con secciones de tallo se obtuvo la formación de 15 propágulos adventicios por explante de forma directa en 12 semanas utilizando un medio de cultivo con sales MS modificadas y $0.025 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de 2,4-D + $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de BA (Robert *et al.*, 1987).

Multipliación. En *A. fourcroydes* Lem. se pudieron realizar subcultivos en medios elaborados con $0.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2,4-D + $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BA y con sales MS modificadas (KNO_3 , 5.0 mM; NH_4NO_3 , 18.0 mM), además de la formación de 1-6 propágulos por planta; este trabajo también señaló la presencia de callo caulogénico (formación excesiva de tejido del tipo estructura globular) en la base de las plantas al utilizar un medio con 0.025 mg L^{-1} de 2,4-D + $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y sales MS modificadas (Robert *et al.*, 1987). También Binh *et al.* (1990) en *A. cantala* Roxb., *A. fourcroydes* Lem. y *A. sisalana* Perrine lograron realizar subcultivos en un medio formulado con sales MS, 2 % de azúcar, 10 % de agua de coco, 0.8 % de agar y con $0.075 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA, $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de IBA y $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Kin. De igual forma, Das en 1992 realizó subcultivos utilizando un medio SH enriquecido con $22.2 \text{ }\mu\text{M}$ de BA, con ello logró la formación de 2 a 4 brotes y cuando redujo la concentración de BA a 2.2 o $4.4 \text{ }\mu\text{M}$ se incrementó el número de brotes de 8 a 12. En *A. parrasana* Berger, Santacruz *et al.* (1999) consiguieron la proliferación de propágulos utilizando un medio MS, 3 % de azúcar, 0.8 % de agar, y vitaminas L_2 y $53.4 \text{ }\mu\text{M}$ de BA, con este medio se formaron 48 brotes por explante (planta obtenida de semilla), cuando se incrementó la concentración de la auxina 2,4-D se redujo la producción de brotes y se promovió la formación de callo, mientras que la reducción en la concentración de BA también redujo el número de brotes. Para el caso *A. cocui* Trelease se obtuvo formación de estructuras globulares verdosas que sembradas en un medio de cultivo con $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y sin auxinas propiciaron la formación de 8.8 ± 6.5 brotes (Yépez, 2000).

Formación de raíz. La formación de raíz en *A. cantala* Roxb, *A. fourcroydes* Lem. (Binh *et al.*, 1990), *A. sisalana* Perrine (Binh *et al.*, 1990 y Das, 1992), *A. arizonica* Gentry & Weber (Powers y Backhaus, 1989) y *A. parrasana* Berger (Santacruz *et al.*, 1999) se obtuvo en 4 semanas con medios de cultivo ricos en sales, sin reguladores de crecimiento y con plantas de 3 cm de altura.

Transferencia a sustrato. Das (1992) en *A. sisalana* Perrine obtuvo un rango de sobrevivencia del 70 a 80 % y Robert *et al.* (1987) en *A. fourcroides* Lem. el 95 % de sobrevivencia al utilizar sustratos como arena, arena mezclada con tierra común, mezclas comerciales para macetas y mezclas a base de tierra común y agrolita en la proporción 1 a 1.

2.5. Constitución genética de los agaves

Los agaves presentan un problema desde el punto de vista taxonómico por su gran variación genotípica y en consecuencia fenotípica, incluso dentro de la misma población y aún en la misma planta (Granados, 1993).

La constitución genética de los agaves presenta varias peculiaridades. Primero, éstos cuando se propagan sexualmente, se polinizan generalmente por polinización cruzada a través de insectos, aves y murciélagos (Granados, 1993) y las plantas que se propagan por esta vía tienen un constante intercambio genético lo que permite un alto grado de heterocigocidad y en consecuencia alta variabilidad genética (Chávez, 1993). Segundo, los agaves que se multiplican vía asexual llegan a presentar diferencias en el número

cromosómico tanto entre especies como entre variedades, esto quizás se deba a que presentan en ocasiones cromosomas que se mantienen unidos en la etapa de división celular generando euploides, aneuploides y autopoliploides; esta conducta (aparentemente irregular) amplía el rango de tolerancia y de distribución, y en un momento dado, puede ayudar a la formación de nuevas especies (Sherman y Bhattacharyya citados por Granados, 1993). Tercero, los agaves presentan alto grado de hibridación intraespecífica e interespecífica, hay evidencias de que *A. inaequidens* Koch está estrechamente relacionada con *A. hookeri*, ambas especies se pueden encontrar creciendo juntas y llegan a cruzarse (Gentry, 1982).

2.6. Caracterización molecular

Los Marcadores Moleculares (MM) han sido útiles para analizar las diferencias en la secuencia del ADN porque permiten determinar polimorfismo genético y los niveles de diferenciación (Arnold *et al.*, 2002). Además, no varían con el ambiente ni dependen del estado fisiológico del individuo (Arcade *et al.*, 2000).

Los organismos vivos pueden revelar regiones con diferentes secuencias nucleotídicas (polimorfismos) que los hacen diferentes de otros individuos y funcionan como una huella genética y como MM (Trigiano y Caetano-Anolles, 1995); para revelar esas regiones se pueden utilizar métodos como los Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción o RFLPs (Botstein *et al.*, 1980), microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) (Weber y May, 1989), los Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos

Amplificados o AFLPs (Vos *et al.*, 1995), la Reacción de la Amplificación de un Iniciador Simple o SPAR, Amplificación de la Huella de ADN (DAF) y los Polimorfismos del ADN Amplificado al Azar o RAPDs (William *et al.*, 1990).

Los marcadores RAPDs se generan de la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y se basan en la utilización de oligonucleótidos de 10 pares de bases (pb) que hibridan al azar con el ADN estudiado. Para que se genere un fragmento de RAPD es necesario que las dos hebras de ADN presenten sitios de hibridación complementarios a los oligonucleótidos y en orientación opuesta, suficientemente cercanas (menos de 3000 pb) como para que sea posible la amplificación. La secuencia de los oligonucleótidos es aleatoria al igual que los sitios de hibridación por lo que las secuencias amplificadas son desconocidas. Los RAPDs son marcadores dominantes y el polimorfismo que se observa entre ciertos individuos consiste en la presencia o ausencia de estos fragmentos de ADN amplificados (Klug y Cummmings, 1999).

El método de RAPDs presenta varias bondades; en primer lugar, no se requiere conocer la secuencia genética, el protocolo es relativamente fácil de realizar, se requieren cantidades pequeñas de ADN y la automatización es posible (Mondragón, 2003). Pero también presenta desventajas, la primera es que los RAPDs son de naturaleza dominante y la identificación de heterocigotos no es posible, además la reproducibilidad de los resultados no es exacta, éstos pueden divergir en función de la competición de los fragmentos de ADN, el

tipo de Taq ADN polimerasa, equipos como el termociclador y el de electroforesis (Williams *et al.*, 1993). Estos inconvenientes pueden ser minimizados si se optimizan los métodos de extracción de ADN, estandarizan las condiciones de laboratorio y se controla la calidad de los reactivos (Mondragón, 2003).

2.6.1. Caracterización molecular en agave

Los RAPDs se han utilizado en algunas especies de agave para obtener huellas genéticas y para determinar la variabilidad genética entre y dentro de poblaciones, tal es el caso de un estudio realizado con *A. tequilana* Weber que tuvo la finalidad de obtener la huella genética y cuantificar la variación genética presente entre y dentro de poblaciones comerciales. En lo que respecta a la huella genética, los RAPDs presentaron 9.8 fragmentos por reacción y sólo se detectó 1.7 % de fragmentos polimórficos (2 fragmentos entre 40 individuos); en relación a la variabilidad genética, ésta fue mínima al obtenerse valores de disimilitud menores a 0.01, es decir, que las parcelas comerciales de Agave Azul son fundamentalmente clones (Gil *et al.*, 2001). En el caso de 6 poblaciones de agaves pulqueros 'Manso' (*A. salmiana* var. 'Salmiana'), 'Ayoteco' (*A. salmiana* var. 'Ayoteco'), 'Verde', 'Carrizo' (*A. mapisaga* Trel), 'Negro' y 'Xilometl', se obtuvieron las huellas genéticas, se determinó la variabilidad genética, las relaciones de parentesco y el nivel de flujo genético. En lo que respecta a la variabilidad genética se encontró baja variabilidad dentro y entre poblaciones, un alto coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ($G_{st} = 0.68$; 68 %) y también se determinó un nivel bajo de flujo

genético ($N_m = 0.24$); estos resultados se atribuyeron a la propagación vegetativa, a la sobreexplotación y a la ausencia de programas de mejoramiento genético (Alfaro *et al.*, 2007). No obstante, se encontraron resultados totalmente diferentes en un complejo de agaves conocido como *A. deserti*, el cual está conformado por los agaves *A. deserti*, *A. cerulata* y *A. subsimplex*; en este complejo se utilizó la metodología de RAPDs para determinar la variación genética y las relaciones de parentesco para entender el proceso de especiación y evolución del género. En este estudio se encontraron bajos niveles de diferenciación entre poblaciones y entre especies (población = 0.14 ± 0.02 (SE); $G_{st} = 0.11 \pm 0.02$) y alta variabilidad genética entre especies ($H_s = 0.12-0.29$, $P = 63.4-95.1$), lo cual se atribuyó al flujo genético que se dio con poblaciones continentales y a la polinización cruzada (Navarro *et al.*, 2003). En otro trabajo, utilizando AFLPs en *A. angustifolia* Haw. proveniente de la Sierra Sonorense de México, se encontró que la especie tuvo bajos niveles de variabilidad genética intra e interpoblacional (80% de bandas polimórficas aproximadamente, con coeficientes de similitud fueron de 0.8 a 0.827 y de 0.749 a 0.786) (Barraza *et al.*, 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la investigación

Se realizó en los laboratorios de Cultivo de Tejidos y Biotecnología Aplicada, así como, en uno de los invernaderos del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2. Colecta del material vegetal

Parte del material vegetal utilizado en esta investigación, se obtuvo de una colecta realizada el mes de marzo de 2004 por productores en las cercanías de la comunidad de San Sebastián del Oeste, municipio de Santiago de Pinos, Jalisco. Las plantas colectadas, usualmente se utilizan para elaborar la bebida “raicilla” pero los productores no conocen el nombre de la especie o especies a las que pertenecen. Tales plantas, presentaron en promedio tres años de edad, fueron arrancadas desde la raíz y transportadas en bolsas de plástico a la Universidad Autónoma Chapingo, donde se establecieron en macetas en uno de los invernaderos del Departamento de Fitotecnia. La otra parte del material vegetal utilizado, fueron plantas de *A. cupreata* Trel. & Berger que se obtuvieron de la siembra, germinación y establecimiento en campo de semillas colectadas en el Estado de Guerrero por la Bióloga Lilián López Chávez del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.3. Realización de la investigación

Antes de iniciar formalmente este estudio, las plantas colectadas fueron identificadas con ayuda de claves taxonómicas, consulta bibliográfica y asesoría de un experto conocedor en plantas crasuláceas y agaves. Esta identificación permitió detectar que el material colectado pertenecía a las especies *A. inaequidens* Koch y *A. maximiliana* Baker.

3.3.1. Cultivo *in vitro* de *A. inaequidens* Koch

El cultivo *in vitro* de esta especie abarcó cuatro etapas: establecimiento *in vitro*, multiplicación, enraizamiento y transferencia a sustrato e invernadero.

3.3.1.1. Establecimiento

Para obtener explantes sanos, las plantas en el invernadero fueron desinfectadas con fungicida y bactericida del tipo sistémico. De éstas fueron retiradas hojas viejas y raíces dejando sólo la “piña” (cuerpo central de la planta) de la cual se aislaron las yemas axilares y el cilindro central del tallo. Los explantes fueron lavados y desinfectados con agua, jabón, tween 60 y agua estéril, posteriormente fueron sumergidos durante 3 min en alcohol al 70 % (v/v), luego en hipoclorito de sodio al 10 % (v/v) durante 3 a 5 min y por último en antioxidante ($150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido cítrico y $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido ascórbico) durante 5 min.

Después del tratamiento, el cilindro central fue cortado en discos de aproximadamente 3 a 4 mm, que al igual que las yemas axilares fueron

sembrados en frascos de 5.5 x 6.8 cm en un medio formulado con sales MS, agar al 0.7 % (p/v), azúcar al 3 % (p/v), 0.2 mg·L⁻¹ AIB, 10 mg·L⁻¹ de BA, 80 mg L⁻¹ de sulfato de adenina, 10 mg·L⁻¹ de tiamina y 10 mg·L⁻¹ de mio-inositol. El pH se ajustó a 5.7.

Todas las siembras realizadas en este trabajo de investigación permanecieron en una cámara de incubación con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad y una temperatura de 26±2 °C. Sólo el periodo de permanencia en la cámara de incubación y la intensidad lumínica fueron modificadas en cada experimento. En éste en particular, los explantes permanecieron un periodo de 8 a 27 semanas con una intensidad lumínica de 30-40 µmol·m⁻²·s⁻¹.

Todos los medios de cultivo, los instrumentos de disección y otros materiales de vidriería fueron esterilizados en una autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 1.4 kg·cm⁻¹ (20 lb·pie⁻¹) durante 45 min; mientras que los medios de cultivo fueron esterilizados sólo durante 25 min.

3.3.1.2. Multiplicación

En esta etapa se realizaron tres experimentos:

Experimento 1. Se probaron 5 concentraciones de BA en el medio de cultivo para promover el desarrollo individual de los brotes formados en la etapa de establecimiento. Para ello, brotes obtenidos de explantes fueron separados y

sembrados en tubos de ensaye de 15x150 mm con 15 mL de medio de cultivo. Éste se elaboró con las sales inorgánicas MS, 80 mg·L⁻¹ de SA, 10 mg·L⁻¹ de tiamina, 10 mg·L⁻¹ de mio-inositol, 0.7 % (p/v) de agar, 3 % (p/v) azúcar y como regulador de crecimiento BA en las concentraciones: 0.0, 0.1, 1.0, 3.0 y 10 mg·L⁻¹. El pH fue ajustando a 5.7. Los brotes sembrados permanecieron seis semanas en la cámara de incubación bajo una intensidad lumínica de 30-40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

El diseño experimental fue completamente al azar con 11 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental estuvo conformada por un tubo de ensaye con dos brotes de tallo de 1 a 2 cm.

Las variables evaluadas fueron:

Incremento en la Altura de planta. Esta variable se determinó en mm con la diferencia entre la altura inicial de la planta (lectura obtenida 3 días después de la siembra) y la altura final.

Incremento en el Número de hojas. Se determinó con la diferencia entre el número de hojas presentes al inicio del experimento y al final de este.

Vigor. Se estimó considerando la coloración de la planta, la turgencia de las hojas y el porcentaje de tejido dañado. Para ello se utilizaron los valores 1, 2 y 3; el valor 1 correspondió a plantas con el menor vigor, es decir, plantas color verde oscuro casi negro, hojas flácidas y deformes; el valor 3 se utilizó para

plantas con alto vigor, es decir, plantas de color verde intenso, hojas turgentes, anchas y sin muestra de tejido dañado mientras que se asignó a el valor 2 un estado intermedio entre los dos anteriores.

Los análisis estadísticos realizados para las variables antes mencionadas fueron: análisis de varianza ($\alpha \leq 0.05$) y comparación de medias (Tukey $\alpha \leq 0.05$). El paquete computacional utilizado para estos análisis fue SAS (Statistical Analysis System) versión 8 (licenciado a la Universidad Complutense de Madrid, 2004).

Experimento 2. Se sembraron brotes de 3 a 4 cm con poda de hojas en tubos de ensaye conteniendo medio de cultivo formulado con sales MS más un complejo vitamínico WS ligeramente modificados (Anexo A), 60 mg·L⁻¹ de SA, 0.7 % (p/v) de agar, 3 % (p/v) azúcar y los reguladores de crecimiento que se muestran en el Cuadro 1.

CUADRO 1. Concentración de tres tipos de reguladores de crecimiento utilizados en la multiplicación de *A. inaequidens* Koch.

Tratamiento	Regulador	Concentración mg·L ⁻¹
1	BA	3
2	BA	10
3	Kin	3
4	Kin	10
5	2 ip	3
6	2 ip	10

Los tubos de ensaye en este experimento permanecieron en la cámara de incubación por 9 semanas a una intensidad lumínica de $30-40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial 3X2 con 12 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fue conformada por un tubo de ensaye conteniendo una plántula.

Las variables evaluadas fueron:

Altura de planta. Se obtuvo la distancia en cm midiendo desde la base de la planta hasta la punta de la misma.

Número de hojas. Se contó el número de hojas totales presentes al final del experimento.

Número de brotes. Se estimó el número de brotes nuevos formados en la base de la planta al final del experimento.

Formación de estructura globular. Se cuantificó como presencia o ausencia de estructura globular en cada plántula y se expresó en porcentaje para cada tratamiento.

Formación de raíz. Se registró la presencia o ausencia de raíz en cada plántula y se expresó en porcentaje por tratamiento.

Los análisis estadísticos realizados a las variables: cuantitativas fueron análisis de varianza ($\alpha \leq 0.05$) y prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha \leq 0.05$). El paquete computacional utilizado fue el SAS versión 8. Las variables cualitativas (formación de estructura globular y formación de raíz) fueron analizadas mediante una prueba de comparación de dos proporciones con muestras independientes ($\alpha \leq 0.05$) (fórmulas en Anexo B).

Experimento 3. En este experimento se sembraron porciones de estructura globular de 8 mm de diámetro en tubos de ensaye conteniendo un medio de cultivo formulado con sales MS más el complejo vitamínico WS (Anexo C), 0.7 % (p/v) de agar, 3 % (p/v) azúcar y el regulador de crecimiento BA. Adicionalmente se añadió y el compuesto orgánico SA en las concentraciones que se muestran en el Cuadro 2.

CUADRO 2. Concentraciones del regulador benciladenina (BA) y el compuesto sulfato de adenina (SA) utilizadas para promover el crecimiento y diferenciación de estructuras globulares en *A. inaequidens* Koch.

Tratamiento	Descripción
1	0.0 mg·L ⁻¹ de BA + 80 mg·L ⁻¹ de SA
2	0.0 mg·L ⁻¹ de BA + 160 mg·L ⁻¹ de
3	0.1 mg·L ⁻¹ de BA + 0 mg·L ⁻¹ de SA
4	0.1 mg·L ⁻¹ de BA + 80 mg·L ⁻¹ de SA
5	1.0 mg·L ⁻¹ de BA + 0 mg·L ⁻¹ de SA
6	1.0 mg·L ⁻¹ de BA + 80 mg·L ⁻¹ de SA
7	3.0 mg·L ⁻¹ de BA + 0 mg·L ⁻¹ de SA
8	3.0 mg·L ⁻¹ de BA + 80 mg·L ⁻¹ de SA

Los tubos de ensaye permanecieron en la cámara de incubación por 12 semanas a una intensidad lumínica de $30-40 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 14 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental fue conformada por un tubo de ensaye conteniendo una porción de estructura globular.

Las variables estudiadas fueron:

Diámetro de estructura globular. Esta variable se cuantificó como la diferencia en diámetro de la estructura alcanzado en la semana 12 en relación al presentado en la primera semana y se expresó en mm.

Número de brotes. Se contabilizó el número de brotes formados en la semana 12.

Longitud de brote. Se estimó la longitud en mm de los brotes totales y se registró su media.

Número de plantas. Se contó el número de brotes o plantas completamente diferenciadas en roseta por tubo de ensaye.

Vigor. Se cuantificó considerando la coloración de la estructura globular la cual debía ser translúcida, la turgencia del tejido y presencia de tejido dañado tanto en estructuras globulares como en brotes (cuando los hubo). Para ello se

utilizaron los valores de 1, 2 y 3; el valor 1 correspondió a estructuras con el menor vigor, es decir, alta proporción de tejido dañado (coloración amarilla o café) o brotes débiles; el valor 3 se asignó a plantas con alto vigor, es decir, con estructuras translúcidas, tejidos turgentes y/o brotes de color verde intenso, mientras que se asignó el valor 2 a un estado intermedio entre los dos anteriores.

Los análisis estadísticos realizados a las variables antes mencionadas fueron, análisis de varianza ($\alpha \leq 0.05$) y comparación de medias (Tukey $\alpha \leq 0.05$). El paquete computacional utilizado para estos análisis fue el SAS versión 8.

3.3.1.3. Enraizamiento

Para promover el enraizamiento se probaron 3 medios de cultivo y 3 tamaños de planta. Los medios de cultivo se formularon con diferentes concentraciones de sales inorgánicas MS y la citocinina 2ip (Cuadro 3). Los tamaños de planta probados fueron: chica (0.8 a 2.8 cm), mediana (2.9 a 3.7 cm) y grande (3.8 a 6.8 cm). Además de lo anterior, en los tres medios de cultivo se utilizó una concentración de azúcar al 3 % (p/v), agar al 0.7 % (p/v), vitaminas WS (Anexo C), 60 mg L⁻¹ de SA y un pH de 5.7. El periodo de incubación fue de seis semanas y la intensidad lumínica de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

El medio de cultivo con sales MS al 100 % + 3.0 mg·L⁻¹ de 2ip se utilizó debido a que en un experimento previo se observó la formación rápida de raíces.

CUADRO 3. Tratamientos probados para promover la formación de raíz en plantas de *Agave inaequidens* Koch.

Tratamiento	Medio de cultivo	Tamaño de planta [¥]
1	MS al 100 % y sin regulador	Chica
2	MS al 100 % y sin regulador	Mediana
3	MS al 100 % y sin regulador	Grande
4	MS al 50 % y sin regulador	Chica
5	MS al 50 % y sin regulador	Mediana
6	MS al 50 % y sin regulador	Grande
7	MS al 100 % + 3.0 mg·L ⁻¹ de 2ip	Chica
8	MS al 100 % + 3.0 mg·L ⁻¹ de 2ip	Mediana
9	MS al 100 % + 3.0 mg·L ⁻¹ de 2ip	Grande

[¥] Planta chica (0.8 a 2.8 cm), mediana (2.9 a 3.7 cm), grande (3.8 a 6.8 cm).

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con arreglo factorial 3x3 con 10 repeticiones por tratamiento donde la unidad experimental se conformó por un tubo de ensaye conteniendo una planta.

Las variables evaluadas fueron:

Número de raíces. Se contabilizó semanalmente el número de raíces formadas.

Longitud de raíces. Se midió la distancia en cm de las raíces desde la base de la planta hasta la punta de la raíz más larga.

Los análisis estadísticos realizados a las variables antes mencionadas fueron análisis de varianza ($\alpha \leq 0.05$) y comparación de medias (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

3.3.1.4. Transferencia a sustrato e invernadero

Las plantas enraizadas mediante cultivo *in vitro* fueron transplantadas a vasos de unicel del número 10 conteniendo una mezcla de sustrato compuesta de peat moss (60 %) y perlita (40 %) y se colocaron en un invernadero. Para aclimatar las plantas, las macetas fueron mantenidas en bolsas de plástico por un periodo de tres semanas; en la última de ellas las bolsas se abrieron poco a poco hasta retirarlas completamente. Los tratamientos estuvieron conformados por 3 tamaños de planta: chico (2.5 cm), mediano (4.0 cm) y grande (6.4 cm), y dos cantidades de raíz: poca (2 a 5 raíces) o mucha (7 a 9 raíces). La variable evaluada fue porcentaje de sobrevivencia que se obtuvo al contabilizar el número de plantas vivas 20 días después del trasplante en comparación al total de plantas transplantadas. La unidad experimental fue una planta y el número de repeticiones utilizadas fue de 10. El análisis estadístico realizado fue una prueba de comparación de dos proporciones con muestras independientes ($\alpha \leq 0.05$).

3.3.2. Escalamiento de multiplicación *in vitro*

De acuerdo con la información obtenida en las etapas anteriores, se propusieron estrategias de cultivo *in vitro* para obtener de un sólo explante la mayor cantidad de plantas posibles mediante organogénesis directa.

3.3.3. Caracterización molecular

Para obtener los marcadores moleculares se tomó 3.0 g de tejido de hojas jóvenes de plantas de *A. inaequidens* Koch, *A. cupreata* Trel. & Berger y *A. maximiliana* Baker, el cual se mantuvo en una hielera hasta el momento de procesar.

- La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983). Los 0.3 g de tejido fresco (hoja) se maceraron en nitrógeno líquido evitando el descongelamiento, luego se colocó el tejido pulverizado en un microtubo de 1.5 mL, conteniendo 600 μ L de amortiguador de extracción, se mezcló muy bien, se agitó por unos segundos y después se incubó a 65 °C por 10 min con inversión ocasional de los tubos. Posteriormente se adicionaron 200 μ L de acetato de potasio 5 M, se agitó por inversión y se dejó reposar 30 min en hielo, luego se centrifugó a 15 000 xg durante 10 min a temperatura ambiente, después se transfirió el sobrenadante a otro microtubo conteniendo 700 μ L de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se expuso a -20 °C durante 30 min. Más tarde se centrifugó 5 minutos a 10 000 xg a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se disolvió el precipitado en 200 μ L de solución para diluir, posteriormente se añadió 2 μ L de ARNasa A e incubó a 37 °C por 1 h. Después se adicionó 20 μ L de acetato de sodio 3 M y 200 μ L de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó reposar a -20 °C por 2 horas. Tiempo después se centrifugó 5

se dejó secar la pastilla y se disolvió en 100 μL de TE (Tris 10 mM + Ácido tetraacético-diamina etileno, pH 8; 1 mM EDTA), por último se almacenó a 4 °C.

El ADN obtenido y disuelto en TE fue cuantificado en un espectrofotómetro marca Jenway modelo 6305 UV/vis con una absorbancia de 260 nm. La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa a una concentración de 1.0 % (p/v) y teñidos en una solución de bromuro de etidio ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). Por último, se hicieron diluciones del ADN para obtener una concentración de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para amplificar los RAPDs.

Para la reacción de PCR y la obtención de los patrones RAPDs en un tubo eppendorf se colocó la mezcla de los reactivos mostrados en el Cuadro 4 obteniéndose un volumen total de 25 μL y adicionando al final la enzima Taq ADN polimerasa de Invitrogen®.

Se probaron 30 iniciadores en total: 10 de la serie B y 20 de la serie D de Operon®, pero sólo 7 de la serie B y 6 de la serie D proporcionaron un aceptable patrón de bandeo. La secuencia de estos 13 iniciadores se presenta en el Cuadro 5.

CUADRO 5. Secuencia de los iniciadores utilizados para obtener los patrones RAPD.

Iniciador	Secuencia 5'-3'
OPB01	GTT TCG CTC C
OPB04	GGA CTG GAG T
OPB05	TGC GCC CTT C
OPB06	TGC TCT GCC C
OPB07	GGT GAC GCA G
OPB09	TGG GGG ACT C
OPB10	CTG CTG GGA C
OPD03	GTC GCC GTC A
OPD05	TGA GCG GAC A
OPD08	GTG TGC CCC A
OPD15	CAT CCG TGC T
OPD18	GAG AGC CAA C
OPD20	ACC CGG TCA C

Para realizar la PCR (Reacción en Cadena de la Taq ADN Polimerasa) se utilizó un termociclador Techne modelo TC-412 con un programa específico para agave el cual se compuso de 5 fases: 1) pre-desnaturalización (9 min a 94 °C), 2) desnaturalización (1 min a 94 °C), 3) alineamiento (1 min a 37 °C), 4) extensión (1 min a 72 °C) (la segunda, tercera y cuarta fase se ejecutaron 35 veces) y 5) extensión final (7 min a 72 °C). Todo el proceso duró cerca de 2 horas 38 min.

Después de la reacción de PCR se procedió a realizar electroforesis en un gel de agarosa a una concentración de 1.2 % (p/v) con amortiguador de corrida TAE 1X (Tris base 40 mM, pH 7.6; Acetato de sodio 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0). Dicha mezcla se calentó en un horno de microondas, se vació y se dejó enfriar hasta que solidificara, después se quitó el peine y se agregaron 12.5 μ L de muestra y 2 μ L de colorante de carga en cada pozo del gel, posteriormente, se realizó la electroforesis a 100 V durante 10 min, permitiendo la entrada de las muestras al gel, luego se ajustó el voltaje a 80 V hasta finalizar la electroforesis, después de esto se sacó el gel de la cámara y se tiñó en bromuro de etidio por 15 min; se escurrió el gel y se visualizó bajo luz ultravioleta en un transiluminador Kodak modelo EDAS 290 y por último se fotografió.

Con los patrones de bandeo generados con los 13 iniciadores seleccionados y la metodología de RAPDs se realizaron los siguientes análisis:

- Se construyó una matriz básica de datos de presencia (1) o ausencia (0) de bandas donde, en las columnas, se ubicaron los genotipos y en las filas, las 64 bandas.
- Con esta matriz básica de datos y utilizando el coeficiente de Jaccard (1908, citado por Sokal y Sneath, 1963) se calculó la matriz de similitud utilizando el programa NTSYSpc versión 2.20f (Rohlf, 1992).

- Con la matriz de similitud obtenida del procedimiento anterior se realizó un análisis de agrupamiento y se generó un primer dendrograma utilizando el programa NTSYSpC versión 2.20f (Rohlf, 1992) y la metodología SAHN (Sequential, Agglomerative Hierarchical and Nested) y UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Average). Posteriormente se construyó un segundo dendrograma para corroborar la formación de grupos, éste fue de mayor robustez debido a que se realizaron 1000 remuestreos (bootstrapping) utilizando la matriz básica de datos, el método UPGMA y el programa Free Tree versión 0.9.1.50 (Hampl *et al.*, 2001). Para visualizar el gráfico se utilizó el programa TreeView versión 1.6.6 (Page, 1996).
- Por último, considerando cada especie como una población y con el uso del programa PopGen32 (Yeh y Yang, 1999), se obtuvo el porcentaje de loci polimórficos en las poblaciones, el coeficiente de diversidad de Shannon, el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones, el grado de flujo génico y el dendrograma de poblaciones utilizando el coeficiente de identidad de Nei (1978).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cultivo *in vitro*

4.1.1. Establecimiento

Se logró establecer con éxito el cultivo *in vitro* de *A. inaequidens* Koch. Los explantes que mejor respondieron a la siembra en el medio de cultivo con $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB y $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA fueron las secciones de tallo. Éstas llegaron a formar hasta 78 brotes en un periodo de 8 semanas por vía directa (sin formación de callo). Las yemas axilares por su parte, demoraron hasta 27 semanas y formaron 54 brotes en promedio. Madrigal *et al.* (1989) consiguieron la propagación de agave con tejido de tallo y yemas axilares como explantes, y también, Robert *et al.* (1987) lograron establecer el cultivo *in vitro* de *A. fourcroydes* Lem. con secciones de tallo y un medio de cultivo elaborado con sales MS modificadas y los reguladores 2,4-D ($0.025 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) y BA ($10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), con ello, propiciaron la formación directa de 15 propágulos por explante en 12 semanas, esto representa 63 propágulos menos y un atraso de 4 semanas en comparación con los resultados obtenidos en este trabajo con las secciones de tallo.

Si bien en este experimento no se evaluaron reguladores de crecimiento y desarrollo vegetal, la combinación de auxinas ($0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de AIB) y citocininas ($10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA) en el medio de cultivo propició la brotación axilar en esta especie. Varios autores mencionan que las concentraciones bajas de auxinas

y elevadas de citocininas propician la formación de yemas adventicias, esto es porque los reguladores interactúan en la determinación de la ruta que seguirá la diferenciación celular hasta obtener una respuesta de la planta (Hurtado y Merino, 1987; Salisbury y Ross, 1994; Jankiewicz, 2003), en este caso la respuesta se tradujo en la formación de nuevos brotes.

En la Figura 3 se observan las plantas madres utilizadas en este trabajo de investigación de donde se obtuvieron los explantes para el establecimiento *in vitro*, así como la evolución que presentó una sección de tallo hasta obtener brotes totalmente diferenciados.

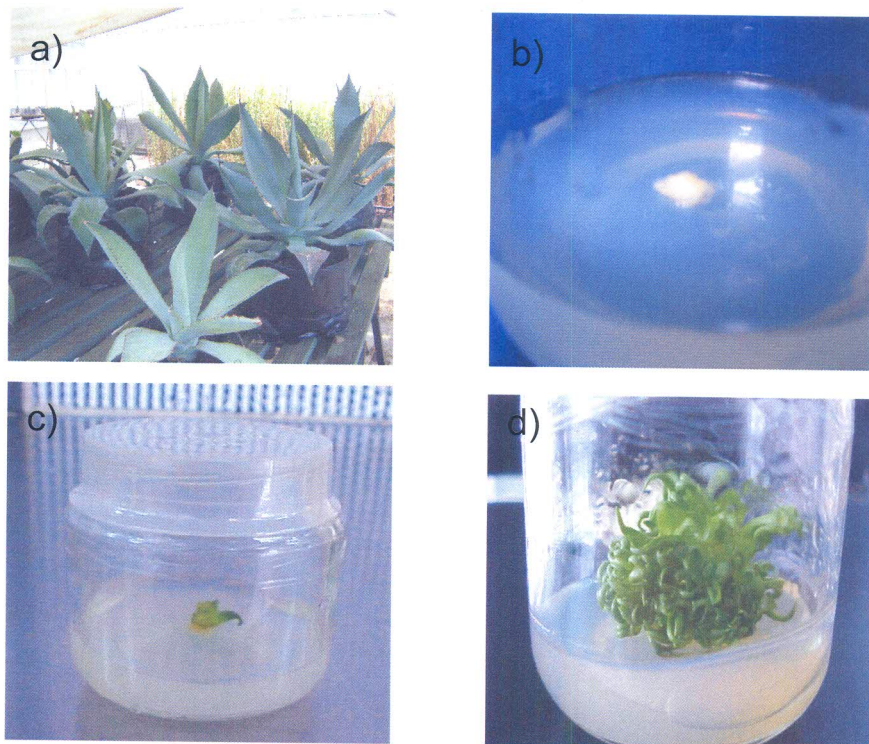


FIGURA 3. Establecimiento *in vitro* de *A. inaequidens* Koch. a) plantas madre, b) secciones de tallo *in vitro* (1ª semana), c) inicio de la brotación (4ª semana), d) 78 brotes totalmente diferenciados (8ª semana).

4.1.2. Multiplicación

4.1.2.1. Experimento 1

Se probaron 5 concentraciones de BA para propiciar el desarrollo individual de los brotes o propágulos obtenidos en la fase de establecimiento (Figura 4a y 4b). Se encontró significancia estadística ($\alpha \leq 0.05$) para las variables incremento en la altura de planta e incremento en el número de hojas. La variable vigor no mostró significancia estadística alguna (Cuadro 6). Las mejores respuestas estadísticas se encontraron con las concentraciones de 1.0 y 3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA; con la de 3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ se incrementó 6.39 mm la altura de la planta y 2.02 el número de hojas en un periodo de 6 semanas, y con la de 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA se incrementó 5.53 mm la altura de planta y 2.04 el número de hojas (Cuadro 6 y Figura 4c). Además se observó (aunque no fue evaluado) que con la concentración de 3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA se formaron hojas visiblemente más anchas en comparación con los demás tratamientos.

CUADRO 6. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística de las variables de crecimiento y vigor de *A. inaequidens* Koch seis semanas después de la siembra en medios de cultivo con cinco concentraciones de BA.

Concentración de BA ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	IAP [€] (mm)	INH	V (escala 1,2,3) [¶]
0.0	2.18 b ^Ω	0.56 b	1.36 a
0.1	2.91 ab	1.10 ab	1.64 a
1.0	5.53 ab	2.04 a	2.09 a
3.0	6.39 a	2.02 a	2.27 a
10.0	2.50 ab	1.52 ab	1.95 a
CV	82.86	64.4	43.53
Significancia ^{¶¶}	*	*	n.s.

[€] IAP=Incremento en altura de planta, INH=incremento en el número de hojas, V=vigor

[¶] 1= bajo vigor, 2= mediano vigor, 3= alto vigor.

^Ω Medias con la misma letra dentro de columnas son iguales estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

^{¶¶} *, estadísticamente significativo; n.s., no significativo ($\alpha \leq 0.05$).

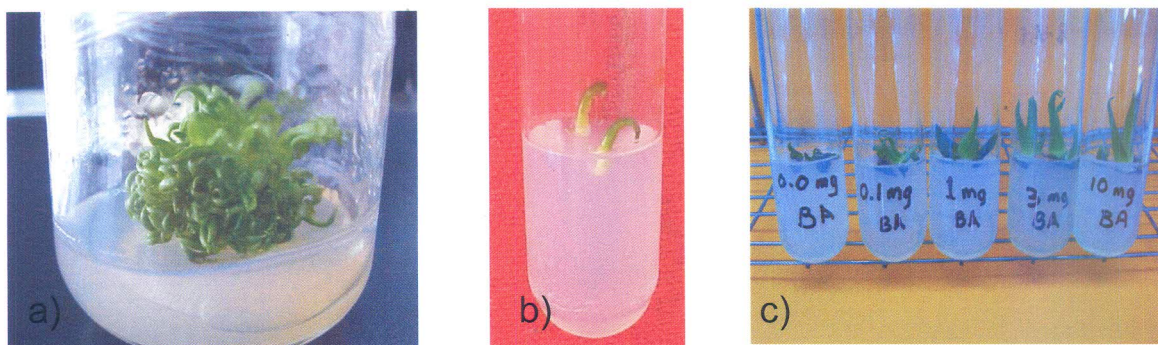


FIGURA 4. Desarrollo individual de *A. inaequidens* Koch utilizando cinco diferentes concentraciones de BA. a) brotes adventicios formados en una sección de tallo, b) separación de brotes, c) respuesta con la aplicación de diferentes concentraciones de BA.

En este experimento la citocinina BA propició la formación de brotes adventicios y eliminó la posibilidad de formar raíz. Estos resultados pueden deberse a que las citocininas suprimen la dominancia apical, promueven la brotación y formación de yemas adventicias e inhiben la formación y el crecimiento de las raíces (Hurtado y Merino, 1987; Salisbury y Ross, 1994; Jankiewicz, 2003). No fue posible determinar con exactitud el número de brotes formados, esto debido a que no se logró distinguir entre hojas y brotes nuevos, las que aparentemente eran hojas resultaban ser brotes y viceversa. No obstante, se logró apreciar la formación en promedio de 1 o 2 brotes por plántula. Madrigal y Díaz (1991) mencionan que *A. inaequidens* Koch se reproduce por hijuelos de forma natural y al parecer algo similar sucede en cultivo *in vitro* ante la presencia BA.

Por otra parte, se observó que esta especie se ve favorecida con el uso de tubos de ensaye, ya que cuando se utilizaron frascos de 5.5 x 6.8 cm algunas plantas extendieron y curvaron sus hojas, de forma tal, que se separó la planta del medio de cultivo lo que impidió el contacto con los nutrientes, situación

indeseable. Además es probable que los altos coeficientes de variación mostrados en el Cuadro anterior se deban a la calidad del agar. Cuando de forma accidental se manejó agar de calidad superior a la utilizada en este experimento, se observó crecimiento más uniforme de plántulas y/o plantas.

4.1.2.2. Experimento 2

En este experimento las plantas fueron sembradas después de podar de hojas (Figura 5a) en medios de cultivo elaborados con las concentraciones de 3.0 y 10.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de los reguladores BA, Kin y 2ip. Se encontró significancia estadística en las variables: altura de planta, número de hojas, número de brotes y formación de raíz. La variable altura de planta, presentó significancia estadística ($\alpha \leq 0.05$) en los factores regulador de crecimiento y concentración, así como en la interacción concentración-regulador de crecimiento. Estos resultados indican que el tamaño de planta obtenido fue regulado tanto por el tipo de regulación de crecimiento como por la concentración utilizada. El tratamiento con 3.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Kin presentó la mayor altura de planta con 4.34 cm (Figura 5b).

Con respecto a la variable número de hojas, únicamente la interacción concentración-regulador de crecimiento presentó significancia estadística ($\alpha \leq 0.05$), es decir, que la formación de nuevas fue regulada por el tipo de regulador de crecimiento en combinación con la concentración. Los tratamientos que propiciaron una mayor cantidad de hojas fueron los

tratamientos con $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA y $10.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Kin con 5.86 y 4.71 hojas en promedio, respectivamente. Por su parte, la variable número de brotes, únicamente presentó significancia estadística ($\alpha \leq 0.05$) para el factor concentración, es decir, que la formación de brotes fue promovida por la concentración del regulador independientemente del tipo de éste. La concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ propició la mayor cantidad de brotes con 2.4 brotes en promedio (Cuadro 7).

Los resultados obtenidos en este experimento demuestran que la brotación en *A. inaequidens* Koch únicamente se promueve con la aplicación de citocininas en el medio de cultivo. Resultados similares fueron encontrados por Santacruz *et al.* (1999) en *A. parrasa* Berger y Das (1992) en *A. sisalana* Perrine. Mientras que Powers and Backhaus (1989) en *A. arizonica* Gentry & Weber, Binh *et al.* (1990) en *A. cantala* Roxb. y Robert *et al.* (1987) en *A. fourcroides* Lem. además de utilizar citocininas, aplicaron auxinas (2-4D, AIB y ANA) en el medio de cultivo para propiciar la formación de brotes. Por lo que de acuerdo a lo encontrado en este trabajo, el uso de auxinas solo representa desperdicio de reactivos ya que se pueden obtener buenos resultados usando solo citocininas.

CUADRO 7. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística de las variables de crecimiento de *A. inaequidens* Koch nueve semanas después de la siembra en medios de cultivo con tres reguladores de crecimiento y dos concentraciones.

Factor	AP* (cm)	NH	NB
Regulador de crecimiento (RC)			
BA	1.97 b [□]	4.21 a	1.92 a
Kin	3.11 a	3.79 a	2.02 a
2ip	2.01 b	3.29 a	1.93 a
Concentración (C)			
3.0 mg·L ⁻¹	2.81 a	3.95 a	1.52 b
10.0 mg·L ⁻¹	1.92 b	3.57 a	2.40 a
Interacción RC x C			
BA + 3.0 mg·L ⁻¹	2.56 b	5.86 a	1.28 a
Kin + 3.0 mg·L ⁻¹	4.34 a	2.86 b	1.71 a
2ip + 3.0 mg·L ⁻¹	1.53 b	3.14 b	1.57 a
BA + 10.0 mg·L ⁻¹	1.39 a	2.57 b	2.57 a
Kin + 10.0 mg·L ⁻¹	1.89 a	4.71 a	2.33 a
2ip + 10.0 mg·L ⁻¹	2.49 a	3.43 ab	2.29 a
BA + 3.0 mg·L ⁻¹	2.56 a	5.86 a	1.28 a
BA + 10.0 mg·L ⁻¹	1.39 b	2.57 b	2.57 a
Kin + 3.0 mg·L ⁻¹	4.34 a	2.86 b	1.71 a
Kin + 10.0 mg·L ⁻¹	1.86 b	4.71 a	2.33 a
2ip + 3.0 mg·L ⁻¹	2.49 a	3.14 a	1.57 a
2ip + 10.0 mg·L ⁻¹	1.53 a	3.43 a	2.29 a
CV	40.99	41.90	35.62
Regulador (RC)	* [¶]	n.s.	n.s.
Concentración (C)	*	n.s.	*
CxR	*	*	n.s.

* AP=altura de planta, NH=número de hojas y NB=número de brotes.

□ Medias de los niveles de los factores con la misma letra dentro de columnas son iguales estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

¶ n.s., no significativo; *, significativo con ($\alpha \leq 0.05$).

La aplicación de los tratamientos propició también la formación de tejido caulogénico con forma globular en la base de las plantas (estructuras

globulares) (Figura 5c). Éste con el tiempo llegó a crecer y diferenciarse en brotes. En la comparación de dos proporciones de muestras independientes, no se encontró significancia estadística ($\alpha \leq 0.05$), lo que indicó que ningún tratamiento destacó en la formación de estructuras globulares. Resultados similares encontraron Robert *et al.* (1987) en *A. fourcroydes* Lem. y Yépez (2000) en *A. cocui* Trelease quienes observaron la presencia de estructuras globulares.

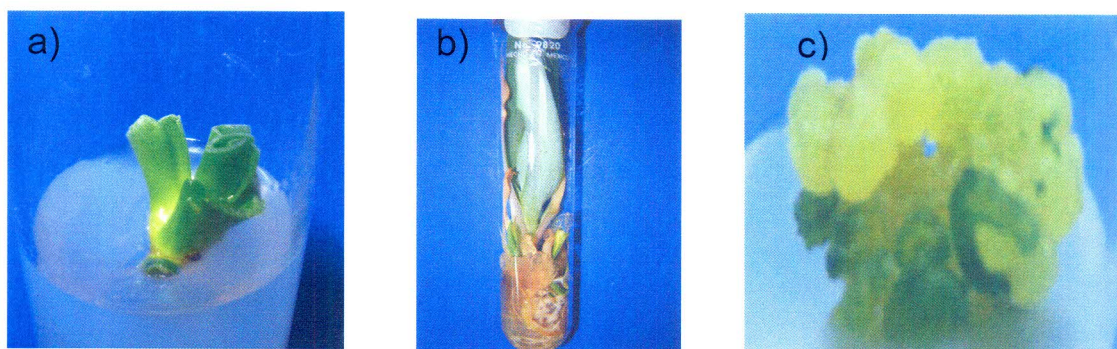


FIGURA 5. Desarrollo en plantas de *A. inaequidens* Koch. a) siembra de planta con poda de hojas, b) plantas con $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de Kin en el medio de cultivo; c) tejido en forma de estructura globular.

En lo que respecta a la formación de raíz, se presentó significancia estadística ($\alpha \leq 0.05$) con las pruebas de comparación de dos proporciones de muestras independientes. Los tratamientos conteniendo BA, independientemente de la concentración utilizada no formaron raíz, mientras que los tratamientos con Kin y Zip en las concentraciones de 3.0 y $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ si produjeron raíces (Cuadro 8).

CUADRO 8. Comparaciones de dos proporciones para las variables formación de estructura globular y raíz en *A. inaequidens* Koch, nueve semanas después de la siembra en medios de cultivo con tres reguladores de crecimiento y dos concentraciones.

Tratamientos comparados	EG [□]		R	
	Proporciones	Valor de z [¥]	Proporciones	Valor de z
T1 [†] vs T2	71.4 vs 85.7	0.65 ns [¶]	0.00 vs 0.00	0.00 ns
T1 vs T3	71.4 vs 85.7	0.65 ns	0.00 vs 71.4	2.79 *
T1 vs T4	71.4 vs 0.00	1.53 ns	0.00 vs 100	3.74 *
T1 vs T5	71.4 vs 0.00	1.53 ns	0.00 vs 100	3.74 *
T1 vs T6	71.4 vs 0.00	1.53 ns	0.00 vs 100	3.74 *
T2 vs T3	85.7 vs 85.7	0.00 ns	0.00 vs 71.4	2.79 *
T2 vs T4	85.7 vs 0.00	1.04 ns	0.00 vs 100	3.74 *
T2 vs T5	85.7 vs 0.00	1.04 ns	0.00 vs 100	3.74 *
T2 vs T6	85.7 vs 0.00	1.04 ns	0.00 vs 100	3.74 *
T3 vs T4	85.7 vs 0.00	1.04 ns	71.4 vs 100	1.53 ns
T3 vs T5	85.7 vs 0.00	1.04 ns	71.4 vs 100	1.53 ns
T3 vs T6	85.7 vs 0.00	1.04 ns	71.4 vs 100	1.53 ns
T4 vs T5	0.00 vs 0.00	0.00 ns	100 vs 100	0.00 ns
T4 vs T6	0.00 vs 0.00	0.00 ns	100 vs 100	0.00 ns
T5 vs T6	0.00 vs 0.00	0.00 ns	100 vs 100	0.00 ns

[□] EG=Estructura globular, R=raíz.

[¥] Estadístico Z valor P≤0.05.

[†] T1= 3.0 mg·L⁻¹ de BA, T2= 10.0 mg·L⁻¹ de BA, T3= 3.0 mg·L⁻¹ de Kin, T4= 10.0 mg·L⁻¹ de Kin, T5= 3.0 mg·L⁻¹ de 2ip, T6= 3.0 mg·L⁻¹ de 2ip.

Según Hurtado y Merino (1987), Salisbury y Ross (1994) y Jankiewicz (2003), las citocininas inhiben la formación y el crecimiento de raíces. No obstante en este experimento, esto se cumplió sólo para el regulador BA y no con Kin y 2ip. Aunque aparentemente estos dos últimos reguladores fueron responsables de la formación y crecimiento de raíces, lo más probable es que su efecto fue nulo, y que la formación y crecimiento de raíz que se observó haya sido resultado de

la presencia de auxinas generadas por la misma planta, ya que éstas promueven la formación y crecimiento de raíces (Hurtado y Merino, 1987; Salisbury y Ross, 1994; Jankiewicz, 2003).

4.1.2.3. Experimento 3

En éste se aplicaron diferentes concentraciones de BA y SA y se encontró significancia estadística ($\alpha \leq 0.05$) para las variables: diámetro de estructura globular, número de brotes, longitud de brotes, número de plantas y vigor de estructura globular. Se observó que las estructuras globulares que fueron sembradas en medios de cultivo sin reguladores y con SA en las concentraciones de 80 y 160 mg·L⁻¹ presentaron deficiente crecimiento, diferenciación (formación de brotes y plantas) y vigor (Figura 6a y 6b). Por el contrario, los tratamientos que mejor favorecieron la expresión de las variables analizadas fueron aquellos con 1.0 y 3.0 mg·L⁻¹ de BA, independientemente de la concentración de SA (Cuadro 9). Como el tratamiento con 1.0 mg·L⁻¹ de BA y sin SA presentó: 15.9 nuevos brotes, 9 planta en promedio y valores aceptables para todas las demás variables, se consideró éste como el mejor tratamiento (Figuras 6c). De acuerdo a lo anterior se sugiere que el regulador BA es el responsable del crecimiento y diferenciación de las estructuras globulares y que el compuesto SA no interviene en forma alguna, aunque en otros trabajos se ha señalado que éste favorece la formación de tallos *in vitro* (George, 1993). Por otra parte, se observó que todos los tratamientos que presentaron formación de brotes, al mismo tiempo presentaron mayor

crecimiento de tejido caulogénico o estructura globular. Por lo que podría perpetuar indefinidamente este tipo de tejido (Figura 6d). Robert *et al.* (1987) en henequén (*A. fourcroydes* Lem.) encontraron la presencia de tejido caulogénico en la base de las plantas cultivadas *in vitro*, el cual al sembrarse en medios de cultivo con la citocinina BA y la auxina 2,4-D formó brotes y propició al mismo tiempo el crecimiento de más tejido caulogénico. Así mismo, Yépez (2000) en *A. cocui* Trelease obtuvo estructuras globulares que fueron sembradas en un medio con BA y sin auxinas lo que promovió organogénesis, es decir, la formación de 8.8 ± 6.5 brotes en 8 semanas.

En virtud de que se puede obtener alta cantidad de brotes con estructuras globulares, sería recomendable realizar estudios más profundos y determinar si se presenta algún tipo de variación, ¿en cuanto tiempo? y después de ¿cuántas generaciones? Si bien en este trabajo de investigación se dio prioridad a la obtención de clones que por tanto presentaron características iguales a la planta madre, el empleo de estructuras globulares podría ser útil en otros ámbitos como el mejoramiento genético si se llegara a detectar alguna variación, o de otra forma, si no se presenta tal variación, se podrían obtener mayor número de clones por explante.

CUADRO 9. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística de variables de crecimiento y vigor en *A. inaequidens* Koch, doce semanas después de la siembra en medios de cultivo con diferentes concentraciones de BA y SA.

BA mg·L ⁻¹	SA mg·L ⁻¹	DEG mm	NB	LB (mm)	NP	VG (1-3)
0.0	80	03.3 b ^Ω	2.64 c	2.14 d	0.00 c	1.57 bc
	160	02.9 b	1.36 c	2.93 cd	0.00 c	1.14 c
0.1	0	09.8 b	6.43 bc	4.79 cbcd	1.93 c	2.16 ab
	80	09.0 b	3.79 bc	4.07 cd	1.64 c	2.15 ab
1.0	0	17.5 a	15.93 a	8.14 ab	9.00 a	2.36 a
	80	20.2 a	8.14 b	8.00 ab	5.64 b	2.50 a
3.0	0	19.7 a	13.71 a	9.57 a	4.86 b	2.21 ab
	80	18.4 a	8.50 b	7.36 abc	5.14 b	2.29 ab
CV		59.28	58.45	71.76	66.54	31.99
Significancia [†]		*	*	*	*	*

* DEG=diámetro de estructura globular, NB=número de brotes, LB=longitud de brotes, NP=número de plantas, VG=vigor.

^Ω Medias con la misma letra dentro de columnas son iguales estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

[†] n.s., no significativo; *, significativo con ($\alpha \leq 0.05$).

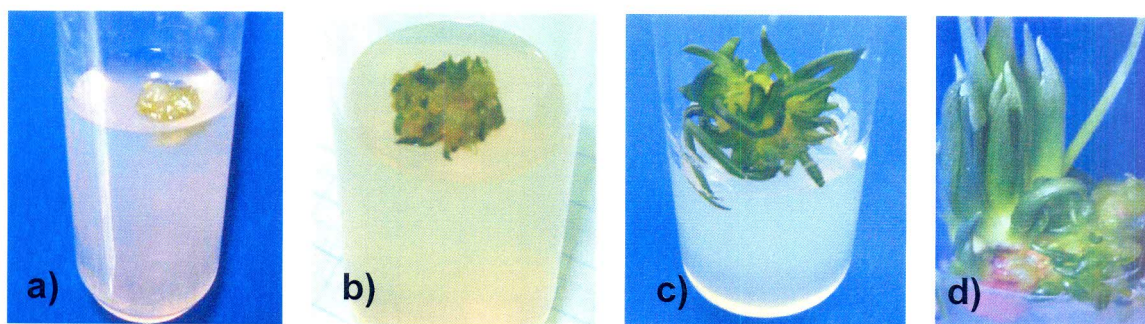


FIGURA 6. a) siembra de estructura globular (semana 1), b) estructura globular en un medio de cultivo 160 mg·L⁻¹ de SA y sin BA (semana 12), c) estructura globular diferenciada en brotes en un medio de cultivo con 1.0 mg·L⁻¹ de BA y sin SA (semana 8), d) estructura globular en un medio de cultivo con 1.0 mg·L⁻¹ de BA y sin SA que muestra brotes totalmente diferenciados (plantas), brotes en formación y presencia de tejido globular (semana 12).

4.1.3. Enraizamiento

En este experimento, se encontró significancia estadística ($\alpha \leq 0.05$) en las variables número y longitud de raíces, para los factores medio de cultivo y tamaño de planta. Es decir, la formación y crecimiento de raíces estuvo regulada por el tamaño inicial de planta y por el medio de cultivo utilizado de forma independiente. En la interacción medio de cultivo-tamaño de planta no se presentó significancia estadística. Por lo que analizados de forma independiente, los tratamientos con sales MS al 50% y MS al 100 % de su concentración, ambos sin regulador de crecimiento en el medio de cultivo, promovieron mayor número y longitud de raíces lo mismo que los tamaños de planta mediano (2.9-3.7 cm) y grande (3.8-6.8 cm). Mientras que las plantas de tamaño chico (0.8-2.8 cm) presentaron dificultades para formar raíz lo mismo que las plantas sembradas en los medios de cultivo con sales MS al 100 % de su concentración + $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ del regulador 2ip (Cuadro 10).

En la Figura 7 y 8 se observan los incrementos en el número y longitud de raíces en un periodo de 6 semanas; se puede apreciar que a mayor tamaño de planta mayor es el número y longitud de raíces y más rápida la formación de éstas, probablemente estos resultados se deban a que una planta con mayor tamaño tiene más reservas. Resultados similares se encontraron en *A. cantala* Roxb, *A. fourcroydes* Lem. (Binh *et al.*, 1990), *A. sisalana* Perrine (Binh *et al.*, 1990 y Das, 1992), *A. parrasana* Berger (Santacruz *et al.*, 1999) y *A. arizonica* Gentry & Weber (Powers y Backhaus, 1989); en estos agaves, la formación de raíces se propició con sales MS al 100 % de su concentración y

sin reguladores de crecimiento. En este trabajo, en 4 semanas, las plantas de tamaño superior a los 3 cm, con la mitad de las sales MS y sin reguladores de crecimiento en el medio de cultivo formaron más de 3 raíces de longitud mayor a 2 cm (Figuras 7 y 8). Como tanto el tratamiento con sales MS al 100 % de su concentración + 3.0 mg·L⁻¹ de 2ip, como el tratamiento con la misma concentración de sales pero sin regulador, formaron ambas raíz, se puede concluir que el regulador 2ip no inhibió la formación de raíz, sino que limitó su número y longitud (Figura 9).

CUADRO 10. Comparación de medias, coeficiente de variación (CV) y significancia estadística para las variables de crecimiento de raíz de *A. inaequidens* Koch seis semanas después de la siembra de tres tamaños de planta en tres medios de cultivo.

	NR ^Ω	LR (cm)
Medio de cultivo (MC)		
MS 100 % y sin regulador	5.47 a*	4.87 a
MS 50 % y sin regulador	4.40 ab	3.76 a
MS 100 % + 3.0 mg·L ⁻¹ de 2ip	2.63 b	1.45 b
Tamaño de planta (TP)		
Chica (0.8-2.8 cm)	2.07 b	2.51 b
Mediana (2.9-3.7 cm)	4.30 a	3.34 ab
Grande (3.8-6.8 cm).	6.13 a	4.24 a
CV	84.85	63.85
Tamaño de planta (TP)	* †	*
Medio de cultivo (MC)	*	*
TP x MC	n.s.	n.s.

^Ω NR=número de raíces, LR=longitud de raíces.

* Medias de los niveles de un factor con la misma letra dentro de columnas son iguales estadísticamente (Tukey, $\alpha \leq 0.05$).

† n.s., no significativo; *, estadísticamente significativo ($\alpha \leq 0.05$).

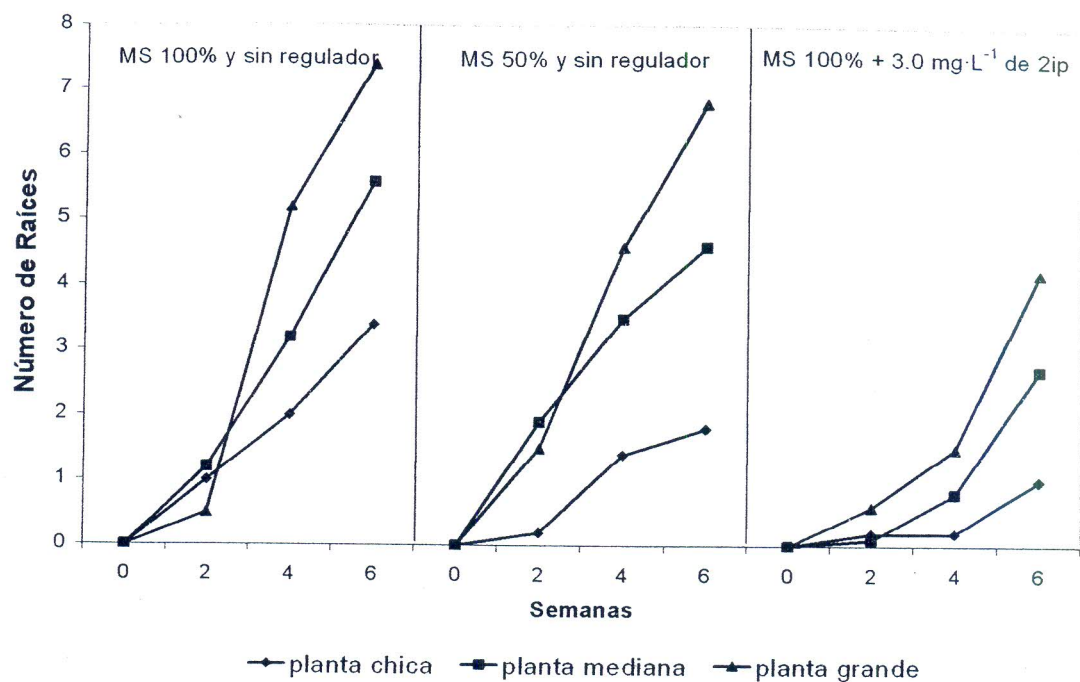


FIGURA 7. Número de raíces formadas *in vitro* en plantas de *A. inaequidens* Koch al utilizar tres medios de cultivo y tres tamaños de planta.

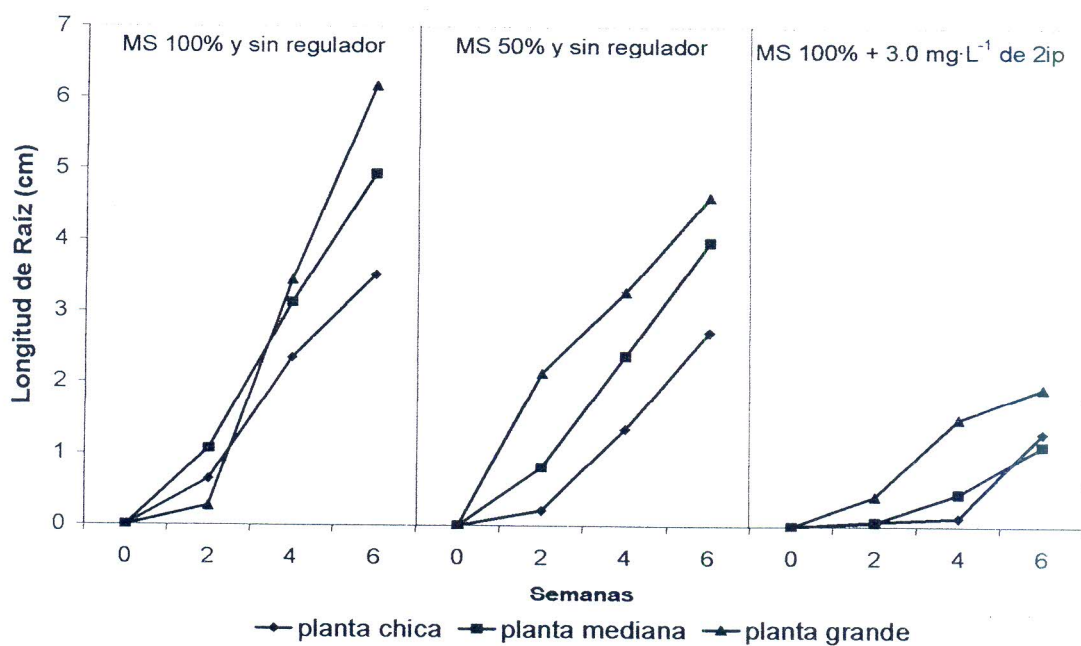


FIGURA 8. Longitud de raíces formadas *in vitro* en plantas de *A. inaequidens* Koch al utilizar tres medios de cultivo y tres tamaños de planta.

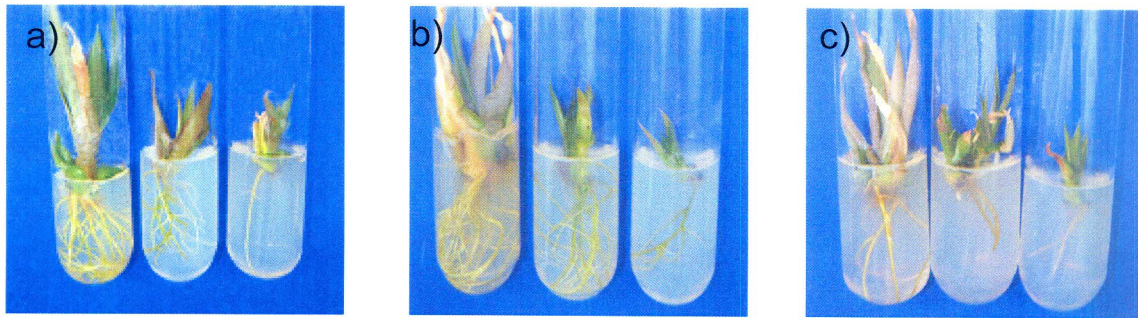


FIGURA 9. Formación de raíz con 3 medios de cultivo y tres tamaños de plantas. a) medio con sales MS al 100 % de su concentración y sin regulador, b) medio con sales MS al 50% de su concentración y sin regulador c) medio con sales MS al 100% + 3.0 mgL⁻¹ de 2ip.

4.1.4. Transferencia a sustrato e invernadero

Cuando las plantas de cultivo *in vitro* fueron transferidas a macetas con una mezcla de sustrato a base de perlita (40 %) y peat moss (60 %) no se presentó significancia estadística ($\alpha \leq 0.05$), en las pruebas con dos proporciones de muestras independientes. Es decir, que todas las plantas independientemente de su tamaño y cantidad de raíz sobrevivieron a la transferencia a sustrato e invernadero (Figura 10). Estos resultados sugieren que para transferir *A. inaequidens* Koch al sustrato antes mencionado, es suficiente con que la planta tenga una altura superior a los 2.5 cm y cuente con tan sólo dos raíces. También Das (1992) en *A. sisalana* Perrine observó un rango de sobrevivencia del 70 a 80 % y Robert *et al.* (1987) en *A. fourcroydes* Lem. encontraron una sobrevivencia del 95 %. Lo anterior sugiere que los agaves en general no presentan mayor problema para transferirse a sustrato e invernadero. Los resultados obtenidos en esta parte de la investigación pueden ser de utilidad

cuando se desee programar las actividades en un laboratorio a nivel comercial. Al mismo tiempo, pueden reducir tiempo de producción y costos.

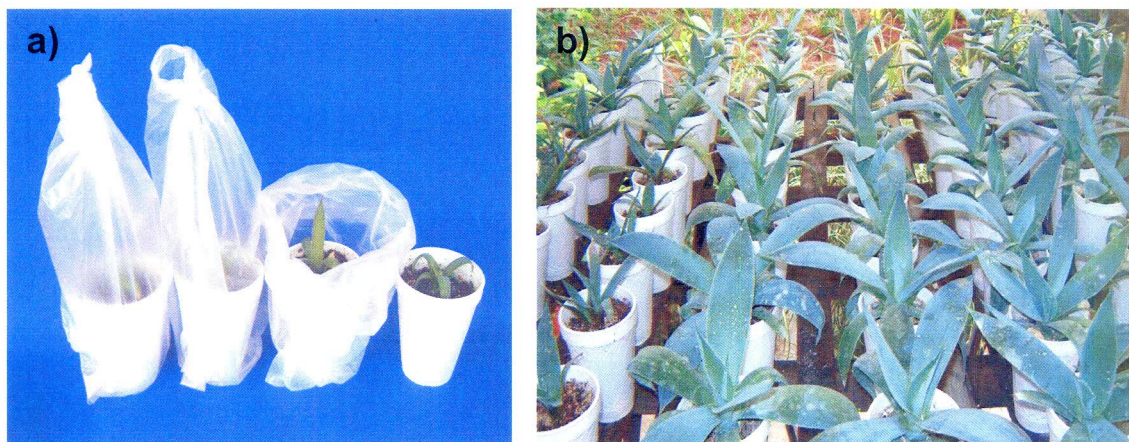


FIGURA 10. Transferencia de plantas de *A. inaequidens* cultivadas *in vitro* a sustrato e invernadero. a) aclimatación de plantas, b) plantas a los 6 meses de la transferencia a sustrato e invernadero.

4.2. Escalamiento de multiplicación *in vitro*

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación, es posible seguir diferentes estrategias para multiplicar esta especie. Si se quisiera establecer una plantación comercial u obtener una multiplicación *in vitro* a gran escala para cualquier otro fin, una propuesta sería la siguiente:

- Establecer el cultivo *in vitro* con secciones de tallo en un medio de cultivo con sales MS, agar al 0.7 % (p/v), azúcar al 3 % (p/v), 0.2 mg·L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB), 10 mg·L⁻¹ de benciladenina (BA), 80 mg·L⁻¹ de SA, 10 mg·L⁻¹ de tiamina y 10 mg·L⁻¹ de mio-inositol. La siembra del explante deberá efectuarse en frascos de 5.5 x 6.8 cm y en un periodo de ocho semanas se obtendrían en promedio 78 brotes por explante.

- Los brotes obtenidos de los explantes, deberán separarse y sembrarse en tubos de ensaye con un medio de cultivo nuevo elaborado con las sales inorgánicas MS, $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de BA, $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de SA, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiamina, $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de mio-inositol, agar al 0.7 % (p/v) y azúcar al 3 % (p/v). En este medio los brotes deberán permanecer por un periodo de 6 semanas para incrementar el vigor, el número de hojas y posiblemente se dé la formación de 1 a 2 brotes nuevos por explante. Con ello se obtendrían 156 plántulas en promedio.
- Las plántulas o plantas deberán separarse de nuevo, podarse las hojas y colocarse en un medio de cultivo fresco formulado con sales MS, el complejo vitamínico WS ligeramente modificado (Cuadro A1), $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de SA, como regulador $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Kin, agar al 0.7 % (p/v) y azúcar al 3 % (p/v). Si se obtienen 3 subcultivos, se formarán en total entre 936 a 1400 plantas en 32 semanas a partir de un sólo explante por vía directa. El último subcultivo deberá realizarse en un medio con la concentración $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 2ip para propiciar crecimiento y formar al mismo tiempo raíz.
- La transferencia a sustrato deberá realizarse con plantas de 2.5 cm de altura o más y con al menos 2 raíces, el sustrato para la transferencia deberá ser una mezcla compuesta por 60 % de peat moss y 40 % de perlita.

4.3. Caracterización molecular

4.3.1. Análisis de RAPDs

Como *A. inaequidens* Koch es una especie silvestre poco estudiada, se aplicó la metodología de RAPDs para determinar algunas características genéticas como la huella, variabilidad y relaciones genéticas en una de sus poblaciones, y compararla con las características genéticas de otras dos poblaciones de agave, una de *A. maximiliana* Baker y otra de *A. cupreata* Trel & Berger, todas pertenecientes al grupo *crenatae* (Gentry, 1982). Los resultados indicaron que de los 13 iniciadores de Operón® probados, siete de la serie B y seis de la serie D amplificaron bandas, cada una de ellas considerada como un locus; cinco iniciadores de la serie B mostraron polimorfismo (número de secuencias nucleotídicas diferentes) superior al 50 % (B01, B04, B05, B06 y B07, con 83.33, 60, 75, 71.43 y 50 %, respectivamente) mientras que los seis iniciadores de la serie D detectaron un polimorfismo menor al 50 %. De 61 bandas totales amplificadas, el 50.82 % mostraron polimorfismo.

Por especie, *A. inaequidens* Koch mostró 1.54 bandas polimórficas en promedio por iniciador, los iniciadores que presentaron mayor polimorfismo fueron el B01 con 66.7 % y B05 y B07 con 50 % en ambos; *A. maximiliana* Baker mostró sólo 0.23 bandas en promedio por iniciador siendo el B01 el que detectó un polimorfismo de 16.66 %, mientras que *A. cupreata* Trel & Berger presentó 1.92 bandas por iniciador en promedio, los iniciadores B01 y B06 proporcionaron el mayor polimorfismo con 75 y 57.14 %, respectivamente (Cuadro 11).

CUADRO 11. Listado de iniciadores y sus secuencias, total de bandas amplificadas, polimorfismo detectado por especie y polimorfismo total presente en tres especies de agave.

Iniciador	Secuencia 5'-3'	Total de bandas amplificadas	Polimorfismo por especie						Polimorfismo total	
			<i>A. inaequidens</i>		<i>A. maximiliana</i>		<i>A. cupreata</i>		No. Bandas	%
			No. de bandas Polimórficas	%	No. de bandas polimórficas	%	No. de bandas polimórficas	%		
OPB01	GTT TCG CTC C	12	8	66.7	2	16.66	9	75	10	83.33
OPB04	GGA CTG GAG T	5	2	40	0	0	2	40	3	60
OPB05	TGC GCC CTT C	4	2	50	0	0	2	50	3	75
OPB06	TGC TCT GCC C	7	3	42.86	0	0	4	57.14	5	71.43
OPB07	GGT GAC GCA G	4	2	50	1	25	2	50	2	50
OPB09	TGG GGG ACT C	2	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB10	CTG CTG GGA C	4	1	25	0	0	0	0	1	25
OPD03	GTC GCC GTC A	7	0	0	0	0	2	28.57	3	42.6
OPD05	TGA GCG GAC A	2	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD08	GTG TGC CCC A	4	1	25	0	0	1	25	1	25
OPD15	CAT CCG TGC T	4	1	25	0	0	1	25	1	25
OPD18	GAG AGC CAA C	4	0	0	0	0	1	25	1	25
OPD20	ACC CGG TCA C	5	0	0	0	0	1	20	1	20
Media		4.69	1.54		0.23		1.92		2.38	

Los resultados anteriores pudieron verse afectados por el tamaño de muestra ya que de *A. maximiliana* Baker se analizaron sólo dos individuos y se obtuvo un menor polimorfismo mientras que de *A. cupreata* Trel & Berger se analizaron 11 individuos y se alcanzó un polimorfismo mayor. De *A. inaequidens* Koch se analizaron 7 individuos y presentó polimorfismo intermedio.

La Figura 11 muestra los patrones RAPD obtenidos con los iniciadores B01 y B06 que funcionan como huella genética. En ellos se observa la presencia de bandas en un rango de 0.30 a 1.0 kb y pocas diferencias entre los genotipos de agave evaluados, lo que sugiere la existencia de baja variabilidad genética, es decir, que entre los individuos estudiados existió un número reducido de secuencias nucleotídicas amplificadas al azar diferentes. Resultados similares encontraron Alfaro *et al.* (2007) en 6 poblaciones de Agave pulquero donde con la técnica de RAPDs se observó baja variabilidad genética lo mismo que Navarro *et al.* (2003) en el complejo de agaves conocido como *A. deserti* (*A. deserti*, *A. cerulata* y *A. subsimplex*). Por su parte, Gil *et al.* (2001) en plantaciones comerciales de *A. tequilana* Weber encontraron mínima variabilidad genética (utilizando las técnicas de RAPDs y AFLPs), mientras que Barraza *et al.* (2006) en *A. angustifolia* Haw. con la técnica de AFLPs observaron alta variabilidad genética.

Los resultados obtenidos muestran que la técnica de RAPDs fue efectiva para determinar polimorfismo genético y niveles de diferenciación como lo sugirieron Arnold *et al.* (2002), esto debido a que los organismos vivos pueden revelar

regiones con secuencias nucleotídicas (polimorfismos) que los hacen diferentes de otros individuos, las cuales pueden fungir como una huella y marcador molecular (Trigiano y Caetano-Anolles, 1995).

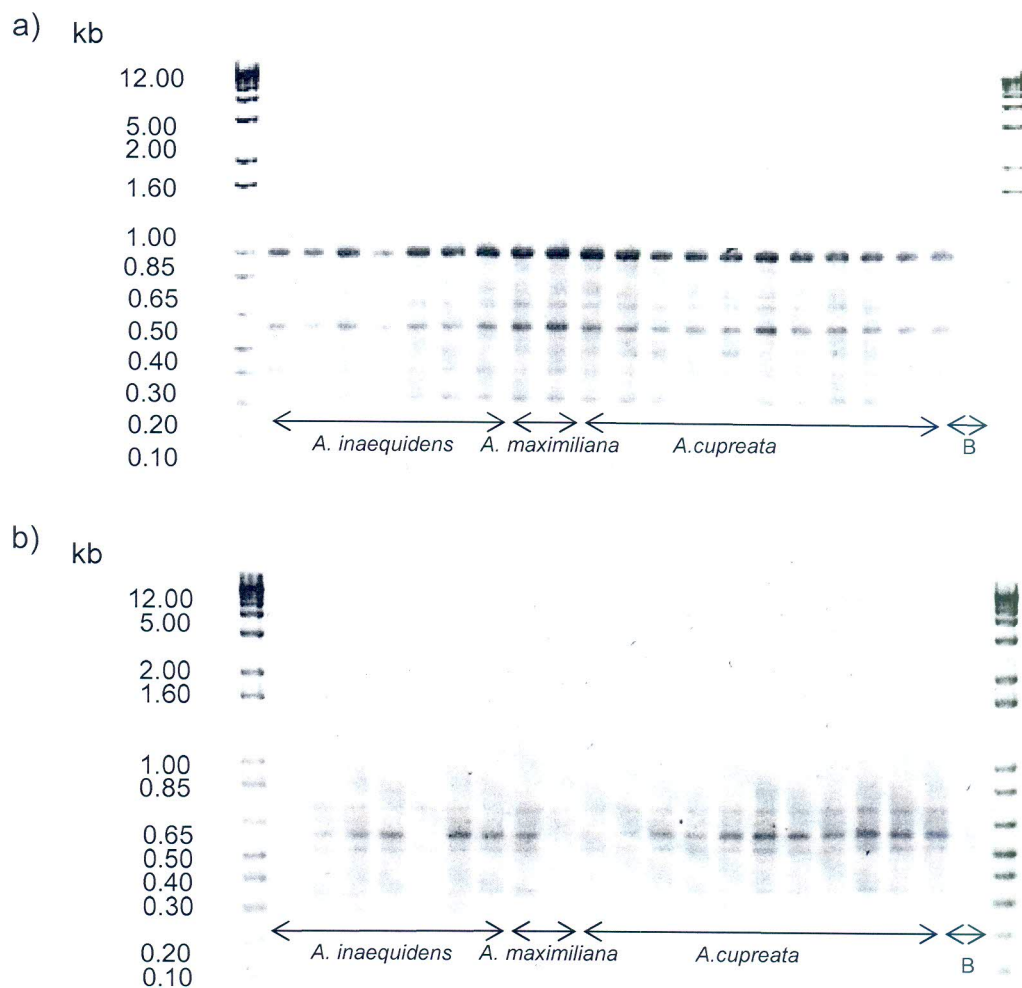


FIGURA 11. Patrones de bandeo RAPDs obtenidos con los iniciadores a) B01 y b) B06. B=blanco.

4.3.2. Agrupamiento

En la Figura 12 se presenta el dendrograma de relaciones genéticas entre 30 individuos de agave obtenido mediante el análisis de los patrones RAPDs con el programa NTSYSpc versión 2.20f. En él se observan tres grupos, el grupo I que agrupa a la mayoría de individuos de la especie *A. inaequidens* Koch, el II agrupa a los individuos de la especie *A. maximiliana* Baker, aunque uno de ellos fue clasificado dentro de *A. inaequidens* Koch (A.INQ06) y el grupo III incluye a todos los individuos de la especie *A. cupreata* Trel & Berger. En la misma Figura 12 se observa que la especie *A. maximiliana* Baker se encuentra más relacionada con *A. cupreata* Trel & Berger con un valor de similitud o distancia genética de 77 % aproximadamente (de acuerdo al coeficiente de Jaccard), mientras que *A. inaequidens* Koch se encuentra más alejada de las dos especies anteriores con un valor de similitud del 75 %.

Para corroborar la formación de grupos se generó otro dendrograma a partir de 1000 remuestreos utilizando la matriz de presencia ausencia de bandas RAPDs y el programa Free Tree Ver. 0.9.1.50 y TreeView versión 1.6.6 (Figura 13). En él se muestra que de 1000 árboles construidos, el 100 % de la veces todos los individuos de *A. inaequidens* Koch (A.INAQ) a excepción de A.INAQ06 quedaron agrupados y separados de *A. CUP* y *A. MAX.*, y 17 % de las veces A.INAQ06 se agrupó con *A. maximiliana* Baker en un mismo grupo, dejando a todos los individuos de *A. cupreata* Trel & Berger (A.CUP) en otro grupo distinto. Esta agrupación es semejante a la obtenida con el programa NTSYSpc versión 2.20f en cuanto a la formación de grupos.

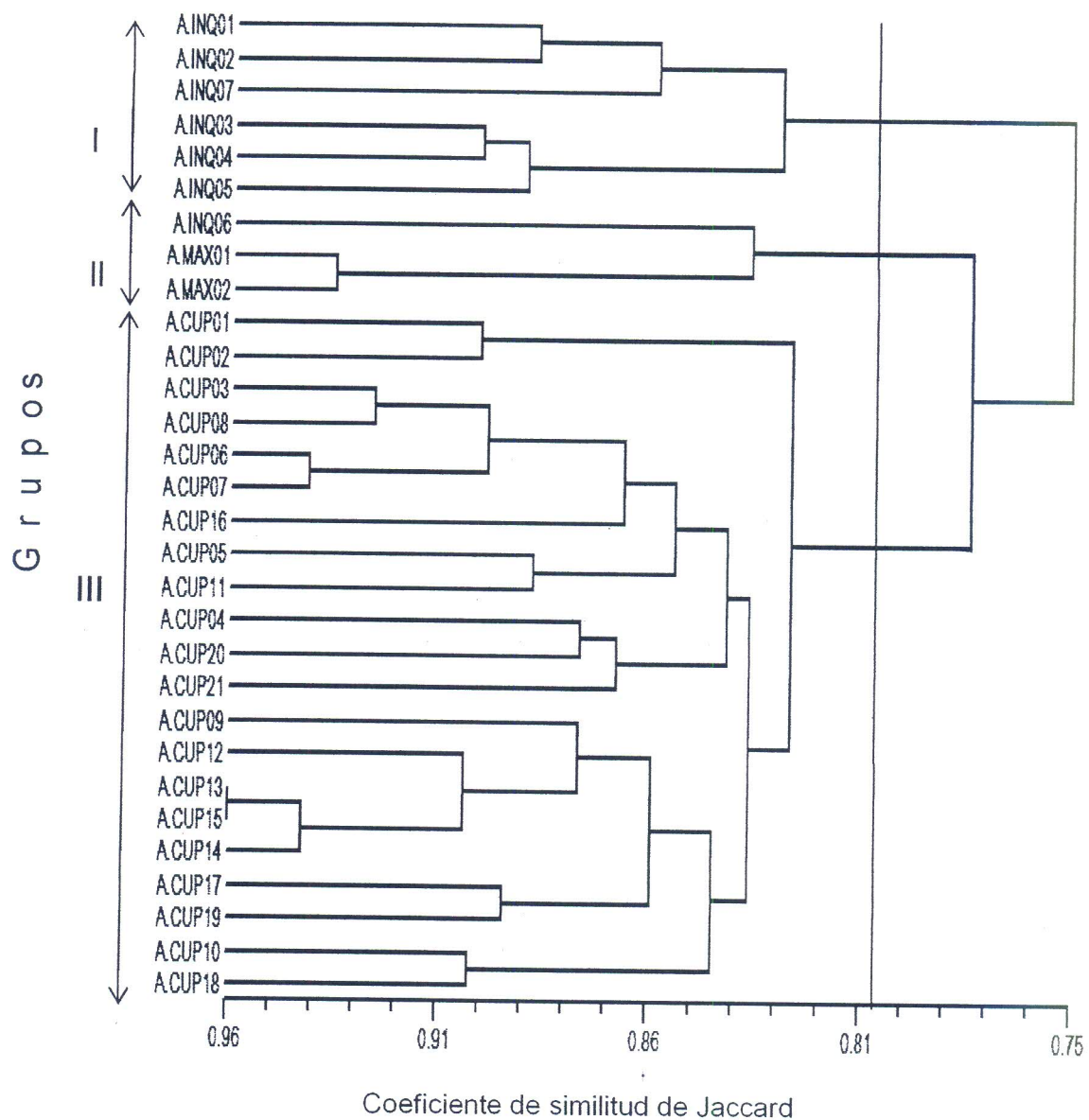


FIGURA 12. Dendrograma construido usando el coeficiente de similitud de Jaccard con los patrones de bandas RAPDs de las especies *A. inaequidens* Koch, *A. maximiliana* Baker y *A. cupreata* Trel & Berger.

Si bien las especies estudiadas pertenecen al grupo *crenatae* donde se incluyen agaves que presenta bordes crenados, espinas dimórficas y flores isogénicas (Gentry, 1982) esto hace suponer que comparten una carga genética común y

los marcadores RAPDs fueron eficientes para discriminar individuos e incluirlos en grupos definidos.

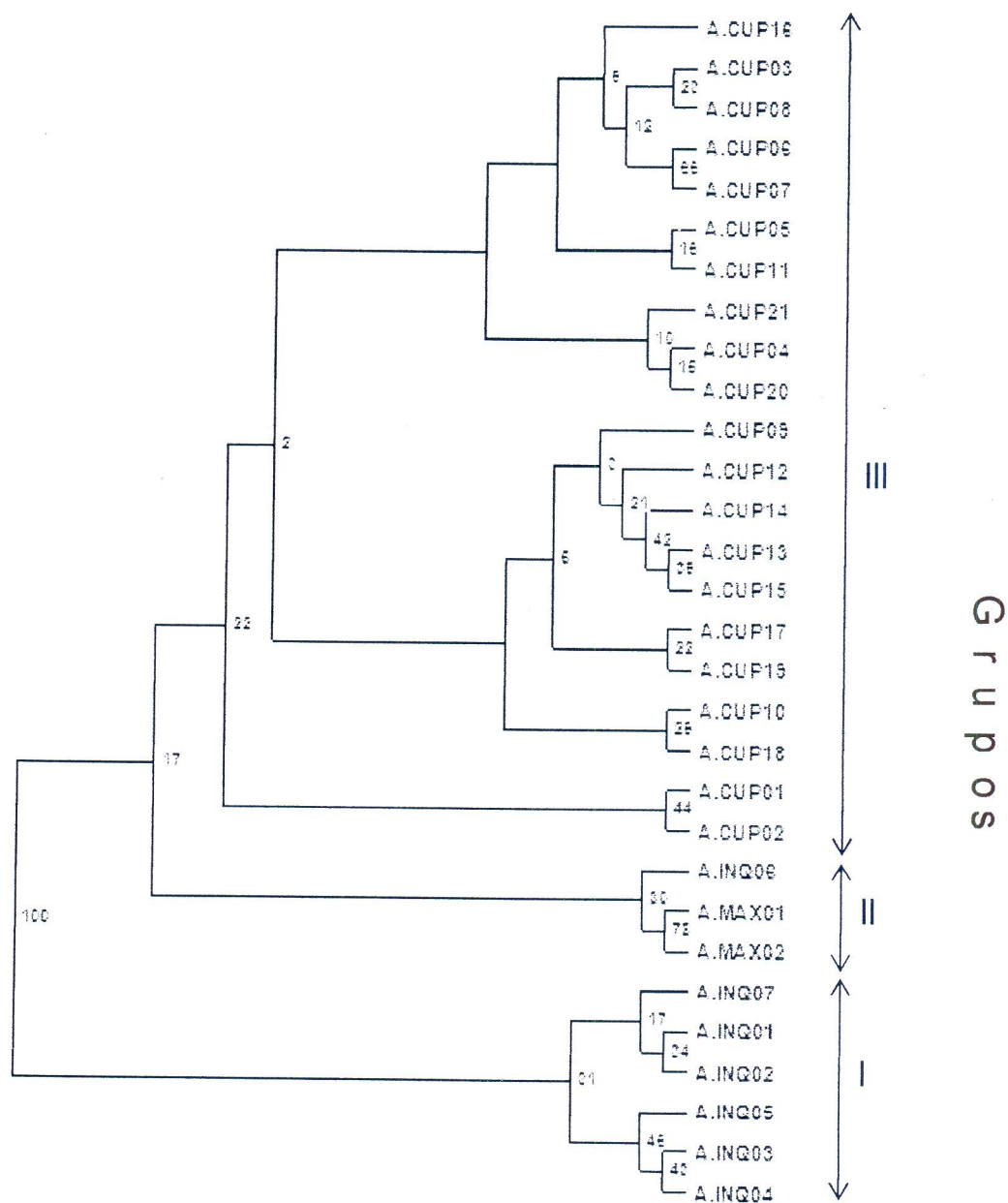


FIGURA 13. Dendrograma construido a partir de 1000 combinaciones de remuestreo obtenido mediante el coeficiente de Jaccard de los productos RAPDs de genotipos pertenecientes a tres especies de agave. Los números en las ramas indican el porcentaje en que la topología de una rama particular se repite.

Dado que los agaves presentan ciertas peculiaridades que marcan su constitución genética y variabilidad, podría esperarse mayor variación genética situación que no ocurrió en este trabajo de investigación. Chávez (1993) menciona, que las plantas que se propagan por polinización cruzada como los agaves, tienen constante intercambio genético que les permite un alto grado de heterocigocidad y en consecuencia alta variabilidad genética. Sherman y Bhattacharyya (citado por Granados, 1993) mencionan que los cromosomas en algunas especies de agave no se transfieren de forma totalmente independiente a las células hijas durante la división celular, es decir, los cromosomas se mantienen unidos y ocasionalmente se fragmentan generando variabilidad. De igual forma Granados (1987) también menciona que en agaves; la hibridación intraespecífica e interespecífica es frecuente lo cual es fuente de variación. No obstante es común que estas especies se multipliquen vegetativamente por rizomas, hijuelos, bulbilos (Gentry, 1982) o por cultivo de tejidos *in vitro* (Gentry, 1982; Granados, 1987; Madrigal, 1991) lo cual perpetua invariablemente las características genéticas de los progenitores y disminuye la variabilidad, en especial en especies domesticadas como en *A. tequilana* Weber (Gil *et al.*, 2001).

En particular para la especie *A. inaequidens* Koch no presenta domesticación alguna, es decir, sólo se encuentra de forma silvestre y rústica; razón por la cual se conoce con el nombre común de 'maguey bruto' (Gentry, 1992). No se conoce con certeza el tipo de reproducción que predomina en esta especie, ni su constitución genética, sin embargo, se tiene conocimiento de que se

reproduce vegetativamente por hijuelos (Madrigal y Díaz, 1991) lo cual explica la baja variabilidad genética encontrada. No obstante puede cruzarse con *A. hookeri* Jacobi (Gentry, 1992) y formar híbridos viables lo que podría explicar la inclusión del ejemplar A.INQ06 dentro del grupo II de las Figuras 12 y 13 aunque fenotípicamente se parece más a los especímenes del grupo I.

De igual manera, la especie *A. maximiliana* Baker no ha sido objeto de domesticación ni de estudio, lo que explica la reducida disponibilidad de planta para producir la “raicilla”, ya que junto con *A. inaequidens* Koch y *A. hookeri* Jacobi son la materia prima para elaborar esta bebida (Anónimo, 2003). El caso de *A. cupreata* Trel & Berger es diferente, porque aunque presenta alta domesticación, aún se pueden encontrar algunas poblaciones silvestres (Gentry, 1982) y en este trabajo de investigación las plantas utilizadas se obtuvieron de semillas colectadas en campo, lo que permitió su agrupación en el grupo III (Figuras 12 y 13).

4.3.3. Análisis de poblaciones

Con la finalidad de encontrar mayores diferencias y similitudes genéticas entre las especies estudiadas, se realizó un análisis poblacional donde se consideró cada especie como una población.

Con ayuda del programa PopGen32 se determinó que las especies estudiadas presentan un porcentaje total de *loci* polimórficos (P) de 46.88 %; los individuos de *A. inaequidens* Koch mostraron un porcentaje de 31.25 %, los de *A.*

maximiliana Baker 4.69 % y los de *A. cupreata* Trel & Berger 37.50 %; mientras que el coeficiente de diversidad de Shanon (S) para todos los *loci* de las tres poblaciones estudiadas fue de 0.231; para *A. inaequidens* Koch el valor de H fue de 0.146, para *A. maximiliana* Baker de 0.028 y para *A. cupreata* Trel & Berger 0.198, ambos indicadores (P y S) corroboran la existencia de baja variabilidad genética en las poblaciones lo que coincide con lo obtenido en los análisis anteriores. En relación al coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) se alcanzó un valor de 0.46 (46 %) que representa un valor medio e indica que las poblaciones (en este caso las especies) están medianamente diferenciadas genéticamente entre una y otra.

En relación al nivel promedio de flujo genético (N_m) se encontró un valor de 0.58 que indica que existe menos de un individuo migrante por generación (Cuadro 12), es decir, que si bien las especies estudiadas pertenecen al mismo grupo taxonómico (Crenatae) y pueden presentar hibridación interespecífica el flujo de genes es muy limitado. Estos resultados son en parte similares a los obtenidos por Alfaro *et al.* (2007) en poblaciones de agave pulquero donde se encontró baja variabilidad genética dentro y entre las poblaciones estudiadas (valores de 12.20 a 32.52), una alta diferenciación de poblaciones ($G_{ST}=0.68$; 68 %) y un nivel bajo de flujo genético ($N_m=0.24$) estos resultados fueron atribuidos a la propagación vegetativa y a la sobreexplotación.

En la Figura 15 se muestra un dendrograma que detecta la relación poblacional entre las 3 especies estudiadas, se muestra que *A. cupreata* Trel & Berger y *A.*

maximiliana Baker se encuentran más relacionadas con una menor distancia genética, mientras que *A. inaequidens* Koch se encuentra a mayor distancia genética de las dos especies anteriores, estos resultados son similares a los obtenidos con los dendrogramas mostrados en las Figuras 12 y 13.

CUADRO 12. Diversidad genética dentro y entre poblaciones de tres especies de agave.

Población	P (%)	S	Gst	Nm
<i>A. inaequidens</i>	31.25	0.146(0.239)		
<i>A. maximiliana</i>	4.69	0.028(0.129)		
<i>A. cupreata</i>	37.50	0.198(0.280)		
Entre poblaciones	46.88	0.231(0.277)	0.46	0.58

P= loci polimorficos, S=coeficiente de diversidad de Shanon, Gst=coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones, Nm= grado de flujo génico. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

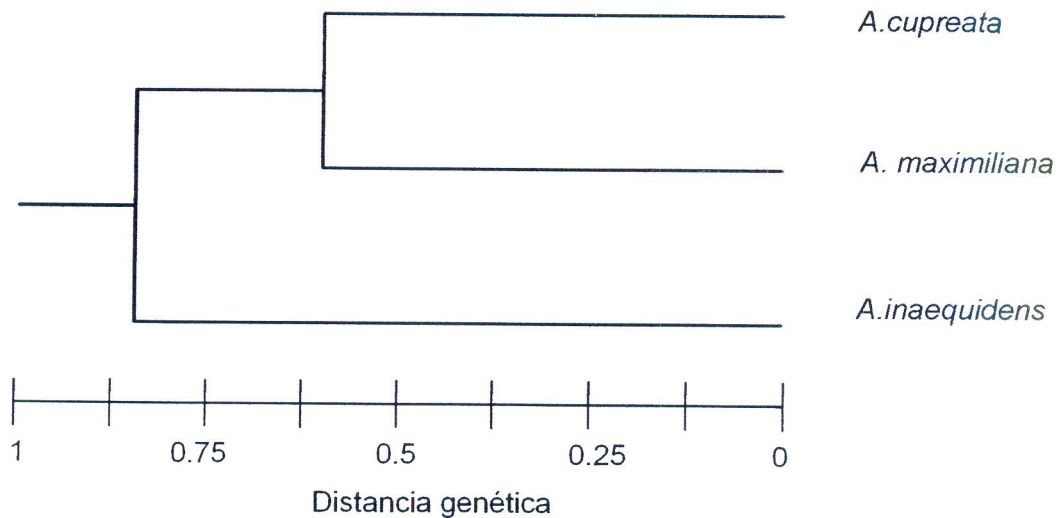


FIGURA 14. Dendrograma de relaciones genéticas entre poblaciones de tres especies de agave, con base en la distancia genética de Nei (1978).

Si bien los marcadores RAPDs permitieron obtener la huella genética, determinar el nivel de variabilidad y establecer relaciones genéticas entre los individuos de las tres especies de agave estudiadas, los resultados obtenidos se pueden considerar no concluyentes debido al bajo tamaño de muestra utilizado, falta de información sobre las colectas, uso de plantas jóvenes que no son del todo útiles para identificar la especie con precisión y la posible presencia de híbridos naturales entre *A. inaequidens* Koch y *A. hookeri* Jacobi (Gentry, 1992). De igual forma para realizar un correcto análisis poblacional se requiere considerar aspectos ecológicos, evolutivos, taxonómicos y demográficos que denotan mayor complejidad. Sin embargo, la información obtenida en esta parte de la investigación proporciona un panorama de las condiciones genéticas presentes en las 3 poblaciones estudiadas.

V. CONCLUSIONES

Se lograron establecer las condiciones *in vitro* que permitieron la obtención, multiplicación, enraizamiento y transferencia a sustrato e invernadero del 'maguey bruto' (*A. inaequidens* Koch). Las secciones de tallo llegaron a formar 78 brotes de forma directa y plantas sembradas en medios de cultivo con diferentes concentraciones de los reguladores Benciladenina, Kinetina y 2, isopentil adenina, sales Murashige y Skoog (1962) y sulfato de adenina; diferentes tamaños de planta y cantidades de raíz, presentaron significancia estadística para las variables incremento en altura de planta, incremento el número de hojas, altura de planta, número de hojas, número de brotes, diámetro de estructura globular, número de plántulas, vigor, formación de raíz y número y longitud de raíz.

Se logró realizar un escalamiento de producción *in vitro* que permite predecir la obtención de 936 a 1400 plantas a partir de un solo explante de tallo.

Mediante la caracterización molecular con RAPDs se obtuvo la huella genética, variabilidad y relaciones genéticas de tres poblaciones de agave. Se encontró baja variabilidad genética entre los individuos estudiados y se observó que *A. maximiliana* Baker está más relacionada genéticamente con *A. cupreata* Trel. & Berger, mientras que *A. inaequidens* Koch se encuentra a mayor distancia genética.

VI. LITERATURA CITADA

- ANÓNIMO. 2003. La raicilla se niega a perder su imagen cerril. CientoUno 576:7-8.
- AGUILAR D., N. M. 1997. Efecto de citocininas en organogénesis y desarrollo de vainilla (*Vainilla planifolia* Andrews) *in vitro*. Tesis de licenciatura. Chapingo. México. 87 p.
- ALFARO R., G.; LEGARIA S., J.P.; RODRÍGUEZ P., J. E. 2007. Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (*Agave spp.*) del Nororiente del Estado de México. Revista Fitotecnia Mexicana. 30 (1): 1-12.
- ARCADE, A.; ANSELIN, F.; RAMPANT, P. F.; LESAGE, M. C.; PÂQUES, L.E.; PRAT, D. 2000. Application of AFLP, RAPD, and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. Theor. Appl. Genet. 100:299-307.
- ARNOLD, C.; ROSSETTO, M.; McNALLY, J.; HENRY, R. J. 2002. The applications of ISSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae. Am. J. Bot. 89:22-28.

- BARRAZA M., A.; SÁNCHEZ T., F. L.; ROBERT, M., ESQUEDA, M.; GARDEA, A. 2006. Variabilidad genética en *A. angustifolia* Haw. de la sierra sonorense, México, determinada con marcadores AFLP. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 29 (1):1-8.
- BINH, L.T.; MUOI, L.; OANH, H.; THANG, T.; PHONG D. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23: 67-70.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. 1980. Construction of linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Amer. J. Human Genet.* 32:314-331.
- CHAVEZ A., J. L. 1993. *Mejoramiento de Plantas 1*. Ed. Trillas. 2ª ed. México. 131 p.
- DAS, T. 1992. Micropropagation de *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31: 253-255.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, L. J.; HICKS, J. B. 1983. A plant DNA miniprep. Versión II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- GEORGE, E. F. 1993. *Plant propagation by tissue culture. Part one. Second edition*. Exegetics Limited. Britain. 526 p.

GENTRY, H. S. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona. pp. 340-344.

GIL V., K.; GONZALEZ, M.; MARTÍNEZ DE LA V., O.; SIMPSON, J.; VANDEMARK, G. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119:335-341.

GRANADOS S., D. 1993. Los Agaves en México Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 252 p.

HAMPL, V.; PAVLÍCEK. A.; FLEGR, J. 2001. Construction and bootstrapping analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonal parasites. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 51:731-735.

HURTADO V., D.; MERINO M., M. E. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas. México. 232 p.

JANKIEWICZ, S. L. 2003. Reguladores de Crecimiento, Desarrollo y Resistencia en Plantas. Propiedades y Acción. Ed. Mundi- Prensa. México. 487 p.

- KLUG, W.S.; CUMMINGS, M.R. 1999. Conceptos de Genética. Ed. Prentice Hall. 5ª ed. España. 840 p.
- MADRIGAL S., X.; DÍAZ B., O. 1991. Un caso teratológico de fasciación en *A. inaequidens* C. Koch (Amaryllidaceae) en la cuenca de Pátzcuaro, Michoacán (México). Acta Botánica Mexicana 15:65-70.
- MADRIGAL L., R.; PINEDA-ESTRADA, F.; RODRÍGUEZ DE LA O, J. L. 1989. Agave. In: Ammirato P V, Evans D A, Sharp W R & Bajaj YPS (Eds) Handbook of Plant Cell Culture, Vol 5. Ornamental Species, Chapter 9 (pp 206-227). McGraw Hill Publ. Co., New York.
- MELDA B., G.; RUÍZ M., L. 2004. Comparación del crecimiento de magueyes pulqueros (*Agave salmiana* Otto ex. Salm y *Agave mapisaga* Trel.) bajo esquemas de propagación *in vitro* y condiciones de invernadero. Biología Scripta Maqueda 1:1-6.
- MONDRAGÓN C., J. 2003. Molecular characterization using RAPDs of cactus (*Opuntia* spp. Cactaceae) collection from Central México as basis for plant breeding. Revista Chapingo Serie Horticultura 9(1):97-114.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.

- NAVARRO Q., A.; GONZÁLEZ C., R.; MOLINA F., F.; EGUIARTE, L. 2003. Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonora desert. *Heredity* 9: 200-227.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- PAGE, R. D. M. 1996. Tree view: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in Biosciences* 12:357-358.
- POWERS, E.D.; BACKHAUS, R. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry and Weber. *Plant cell, Tissue and Organ Culture* 16: 57-60.
- ROBERT, M.L.; HERRERA, J.L.; CONTRERAS, F.; SCORER, K.L. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequén). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 8: 37-48
- ROHLF, F. J. 1992. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system (version 2.1). State University of New York. Pp
- SALISBURY, B. F.; ROSS, W.C. 1994. *Fisiología Vegetal*. Ed. Iberoamericana. México. 759 p.

- SANTACRUZ R., F.; GUTIERREZ, H.; RODRÍGUEZ, B. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. Plant cell, Tissue and Organ Culture 56: 163-167.
- SOKAL, R. R.; SNEATH, P. H. 1963. Principles of numerical taxonomy Freeman. San Francisco. 359 p.
- TRIGIANO, ROBERT N.; CAETANO-ANOLLES, G.; BRANT J. BASSAM, G. B.; WINDHAM, M.T. 1995. DNA amplification fingerprinting provides evidence that *Discula destructiva*, the cause of dogwood anthracnose in North America, is an introduced pathogen. Mycología 87(4): 490-500.
- UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. 2004. Curso de introducción a la programación SAS® V8. Servicios informáticos de apoyo a docencia e investigación. Apoyo a investigación. 74 p.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN J. KUIPER, M. AND ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res. 23:4407-4414.

- WEBER, J. L.; MAY, P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44:388-396.
- WETMORE, R.H.; SOROKIN, S. 1955. On the differentiation of xylem. *Journal of the Arnold Arboretum.* 36: 305-317.
- WILLIAMS, J.G.; KUBLIK, K.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, K.J. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.
- YEH, C.; YANG, R. 1999. Popgene Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International Forestry Research. 29 p.
- YÉPEZ, L. 2000. Proyecto "Selección y clonación *in vitro* de un genotipo promisorio en *Agave cocui* Trelease". Informe de avances de resultados. FUNDACITE-FALCON. Caracas Venezuela. Mimeografiado. 42p.

VII. ANEXO

ANEXO A. Composición de las vitaminas WS modificadas por Lozoya y Aguilar (Aguilar, 1997).

COMPUESTO	CANTIDAD PARA 100 ml DE SOLUCIÓN MADRE
TIAMINA HCL	10 mg H ₂ O
PANTOTENATO DE CALCIO	10 mg H ₂ O
MYO-INOSITOL	100 mg H ₂ O
PIRIDOXINA	10 mg H ₂ O
ÁCIDO NICOTÍNICO	50 mg NaOH
RIVOFLAVINA	5 mg NaOH
ÁCIDO FÓLICO	1 mg NaOH
BIOTINA	0.1 mg H ₂ O
ÁCIDO PARA-AMINOBENZOICO	5 mg NaOH

ANEXO B. Fórmulas utilizadas para comparar dos proporciones de muestras independientes.

$$n_a = a + c$$

$$n_b = b + d$$

$$p = (a + b) / (n_a + n_b)$$

$$p_a = a / n_a$$

$$p_b = b / n_b$$

$$EE = \sqrt{\frac{p(1-p) + p(1-p)}{n_a}}$$

$$d = p_a - p_b$$

$$z = d / EE$$

$$z \text{ de tabla } (\leq 0.025) = 1.96$$

Donde:

a = número de éxitos del tratamiento 1

b = número de éxitos del tratamiento 2

c = número de fracasos del tratamiento 1

d = número de fracasos del tratamiento 2

EE = error experimental

z = valor de z calculada

ANEXO C. Composición de las vitaminas WS Wetmore and Sorokin (1955).

COMPUESTO	CANTIDAD PARA 100 ml DE SOLUCIÓN MADRE
TIAMINA HCL	10 mg H ₂ O
PANTOTENATO DE CALCIO	10 mg H ₂ O
MYO-INOSITOL	10 mg H ₂ O
PIRIDOXINA	10 mg H ₂ O
ÁCIDO NICOTÍNICO	50 mg NaOH
RIVOFLAVINA	10 mg NaOH
ÁCIDO FÓLICO	5 mg NaOH
BIOTINA	0.5 mg H ₂ O
ÁCIDO PARA-AMINOBENZOICO	10 mg H ₂ O
GLICINA	10 mg NaOH