

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
TECNOLOGÍA INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA  
GUTIÉRREZ



SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



SEP

## **TRABAJO PROFESIONAL**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

# **INGENIERO BIOQUÍMICO**

**QUE PRESENTA:**

**CLAUDIA IVETH COUTIÑO CONSTANCIO**

**CON EL TEMA:**

**“EFECTO DEL METANOSULFONATO DE  
ETILO EN CALLOS DE *Agave tequilana*.”**

**MEDIANTE:**

**OPCIÓN I**

**(TESIS PROFESIONAL)**

## *Dedicatoria*

*A mis padres Naymer y Elsy por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación al estudiar esta carrera.*

*Doctor Adrián Fernández quien me apoyo y alentó durante toda la carrera.*

*A mis amigas Elizabeth, Nallely y Rosbita por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidare.*

## *Agradecimientos*

*A Dios por brindarme una vida llena de aprendizaje y experiencias.*

*Agradezco la confianza y el tiempo dedicado a apoyarme al Doctor Federico Antonio Gutiérrez Miceli.*

*A mis revisores Doctor Reiner Rincón Rosales, Doctora Roció Meza Gordillo y QBP Aura Flores Pérez quienes dedicaron horas a analizar mi tesis y la aprobaron.*

*Al Doctor Carlos Lecona por haber compartido conmigo sus conocimientos.*

## Índice General

1. Resumen .....	7
2. Introducción.....	8
3. Justificación.....	10
4. Objetivos. ....	11
4.1 Objetivo general .....	11
4.2 Objetivos específicos .....	11
5. Hipótesis.....	11
6. Marco Teórico. ....	12
6.1 Generalidades.....	12
6.2 Clasificación taxonómica y descripción.....	12
6.3 <i>Agave tequilana</i> Weber 1902 (Weber) .....	13
6.4 Distribución .....	14
6.5 Regiones productoras .....	14
6.6 Precipitación, humedad ambiental y del suelo .....	15
6.7 Temperatura.....	16
6.8 Luz .....	16
6.9 Suelo.....	16
6.10 Reproducción del <i>Agave tequilana</i> Weber variedad azul .....	17
6.10.1 Reproducción sexual .....	17
6.10.2 Reproducción asexual .....	18
6.10.3 Bulbillos .....	18
6.10.4 Rizomas (hijuelos) .....	19
6.10.5 Sistema de propagación del <i>Agave tequilero</i> mediante hijuelos .....	20
6.11 Enfermedades bióticas.....	24
6.11.1 Marchitez .....	24
6.11.2 Medidas de control de la marchitez .....	27
6.12 Cultivo de tejidos vegetales.....	29
6.13 Embriogénesis somática .....	29
6.14 Organogénesis <i>in vitro</i> .....	30
6.15 Variación somaclonal .....	31

6.16 Alteraciones genéticas producidas durante el cultivo de tejidos .....	32
6.17 Agentes mutágenos .....	32
6.18 Estudios sobre la aplicación de metanosulfonato de etilo (MSE) en diversos cultivos .....	34
7. Materiales y métodos .....	36
7.1 Desinfección de meristemas .....	36
7.2 Preparación de medios semisólido y líquido .....	37
7.3 Inducción de callos.....	37
7.4 Evaluación del efecto del mutágeno en callos de agave tequilana .....	38
8. Resultados .....	40
8.1 Desinfección de los meristemas.....	40
8.2 Inducción de callos.....	41
8.3 Evaluación del efecto del mutágeno en callos de <i>Agave tequilana</i> Weber variedad azul.....	42
9. Discusión.....	50
10. Conclusiones.....	52
11. Bibliografía.....	53

## Índice de Figuras

Figura 1	<i>Agave tequilana</i> Weber variedad azul	Pág. 13
Figura 2	Fotografía de <i>Agave tequilana</i> enferma de Marchitez	Pág. 25
Figura 3	Acción del agente mutágeno MSE a nivel de ADN	Pág. 31
Figura 4	Detalles del procedimiento para adicionar el mutágeno a los callos de <i>Agave tequilana</i> .	Pág. 33
Figura 5	Meristemo de cogollo de <i>Agave tequilana</i> después de una semana del tratamiento de desinfección.	Pág. 40
Figura 6	Inducción de callo de <i>Agave tequilana</i> .	Pág. 41
Figura 7	Callos de <i>Agave tequilana</i> tratados con MSE por una hora de inmersión.	Pág. 44
Figura 8	Callos de <i>Agave tequilana</i> tratados con MSE por dos horas de inmersión.	Pág. 44
Figura 9	Callos de <i>Agave tequilana</i> tratados con MSE por tres horas de inmersión.	Pág. 45
Figura 10	Diagrama de superficie de respuesta de la interacción entre el tiempo de inmersión y la concentración de MSE sobre la formación de brotes en calos de <i>Agave tequilana</i> Weber variedad azul.	Pág. 48

### Índice de Cuadros

Cuadro 1	Factores y niveles para el diseño de experimentos.	Pág. 38
Cuadro 2	Diseño experimental para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de metanosulfonato de etilo a diferentes tiempos de inmersión	Pág. 39
Cuadro 3	Numero de brotes obtenidos de <i>Agave tequilana</i> Weber variedad azul después de 30 días de la exposición de callos al MSE	Pág. 46
Cuadro 4	Análisis de varianza realizado de acuerdo al diseño de superficie de respuesta	Pág. 47
Cuadro 5	Análisis de varianza para determinar comparar los resultados del tratamiento óptimo (1h de inmersión con 15 mM de MSE) con el tratamiento control (sin la exposición al MSE).	Pág. 49
Cuadro 6	Comparación de medias entre el tratamiento óptimo (1h de inmersión con 15 mM de MSE) con el tratamiento control (sin la exposición al MSE).	Pág. 49

## 1. Resumen

El género *Agave* forma parte de la familia de plantas agaváceas o agavaceae y pertenece a la clase de las monocotiledóneas, más de 200 especies que forman parte de este género, entre las cuales se encuentra el *Agave tequilana* Weber la cual es la única fuente para la producción del tequila, los ingresos de esta práctica son para muchas familias una muy importante fuente de ingresos,

Este cultivo se ha visto afectado por una serie de fitopatógenos que reducen el desarrollo y pueden llegar a causar la muerte de la planta. Dentro de las enfermedades el hongo *Fusarium oxysporum* causa marchites siendo uno de los motivos de la pérdida completa de centenares de cultivos al año.

Una de las alternativas para disminuir el daño causado a las plantaciones de *Agave tequilana* por este hongo, es el de generar clones con resistencia a este patógeno, utilizando como estrategia el uso de agentes químicos como el metanosulfonato de etilo (MSE) el cual ha sido utilizado para generar resistencia a *Fusarium* en cultivos *in vitro* de diversas especies como *Saccharum officinarum* en donde a través de la utilización del MSE se han obtenido plántulas resistentes a *Fusarium sachari* y así mismo se reportó trabajos de *Musa spp* tolerantes a *Fusarium oxysporum*. El presente trabajo tuvo como objetivo analizar la influencia de diferentes concentraciones del metanosulfonato de etilo aplicado a diferentes tiempos de inmersión sobre la formación de brotes en callos de *Agave tequilana* Weber variedad azul. El trabajo se hizo en tres etapas, la primera consistió en la desinfección de meristemas del cogollo provenientes de plantas de 3 meses de edad. En la segunda etapa se promovió la inducción de callos utilizando 0.5 mg/L de 2,4 D como regulador de crecimiento, obteniendo formación de callos a las 16 semanas. Por último se evaluó el efecto del metanosulfonato de etilo adicionándolo sobre estos a distintas concentraciones de 15, 30 y 45 mM con 1, 2 y 3 horas de inmersión, el tratamiento que presentó repuesta a la formación de brotes y regeneración a los 30 días fue el callo tratado con 15 mM por una hora de inmersión.

## 2. Introducción

Los agaves son cultivados en regiones áridas y semiáridas alrededor del mundo para su uso como fibra, alimentos de animales, planta ornamental y para las bebidas alcohólicas (Nobel, 1994). El género contiene 140 especies los cuales constituyen la mayoría de la familia asparagaceae (Gentry, 1982).

El *Agave tequilana* Weber cultivo azul es el más ampliamente cultivado de las especies de agave, sus plantíos abarcan más de 84,000 hectáreas en 5 estados de la República Mexicana, siendo que su cultivo e industrialización para la producción de tequila genera un importante recurso económico (Rodríguez – Garay *et al.*, 2008), representando millones de pesos en ganancias (Consejo Regulador del Tequila, 2006).

El Tequila es una bebida destilada, elaborada de la fermentación del jugo del *Agave tequilana* Weber variedad azul. Tequila es la denominación de origen la cual es reconocida en el mundo entero y su producción es estrictamente regulada por el CRT (Consejo Regulador del Tequila) el cual está encargado de asegurar la autenticidad y calidad de la bebida (Cedeño, 1995).

En los últimos años se ha presentado una disminución en el rendimiento por daños a los cultivos, sobre todo por la presencia de hongos, bacterias e insectos y plagas. Los fitopatógenos reportados como más importantes en el agave tequilero son la bacteria *Erwinia carotovora* que produce la enfermedad llamada “pudrición del cogollo” y el hongo *Fusarium oxysporum* que produce la “pudrición seca de la raíz” o “marchitamiento”. Estas enfermedades que afectan el desarrollo de la planta, se reportaron en trabajos de investigación en los últimos 15 años (Valenzuela, 1994; Aceves, 2003; Virgen *et al.*, 2004). El mejoramiento genético es una alternativa para hacer frente a los problemas de enfermedades en este cultivo, al generar plantas resistentes a plagas de insectos o potenciar alguna característica importante que



pueda hacer más productiva a la planta y esto puede ser realizado a partir del cultivo de tejidos vegetales (Ruvalcaba *et al.* 2000).

Para la creación de variantes somaclonales resistentes a enfermedades o cualquier tipo de estrés, se ha utilizado mutágenos químicos, como el metanosulfonato de etilo (MSE) que pertenece al grupo de los agentes alquilantes, ha sido reportado como un mutágeno muy eficaz y eficiente en cultivos tales como *Saccharum officinarum* en donde a través de la utilización del MSE se han obtenido plántulas resistentes a *Fusarium sachari* (Mahlanza *et al.*, 2013) y así mismo se reportó trabajos de *Musa spp* tolerantes a *Fusarium oxysporum* (Bhagwat y Duncan, 1998).

### 3. Justificación

El Tequila es una de las bebidas más famosas a nivel nacional y mundial, la cual se obtiene de la planta de *Agave tequilana* weber variedad azul, mejor conocido como Agave azul. Dado que el agave es la fuente de ingresos de muchas familias relacionadas desde su cosecha, cultivo, destilación y por último su comercialización, se ha buscado el mejoramiento de los cultivos para aumentar su producción.

Actualmente la industria tequilera presenta diversos problemas, los cuales deben ser tratados de manera inmediata ya que la tendencia de consumo de Tequila continúa a la alza, entre los problemas que encontramos esta, el mejoramiento genérico de difícil aplicación, problemas fitosanitarios y diversidad genética limitada (Gil-Vega, 1997).

Son escasos los trabajos de mejoramiento genético reportados para el género agave, usando técnicas de mejoramiento tradicional solo se reporta la obtención de un híbrido diploide, en lo que respecta a cultivo de tejidos se ha reportado trabajos enfocados principalmente a la propagación masiva con fines industriales y de conservación (Robert y col. ,1992) reportan un sistema de regeneración en *Agave tequilana*.

Tomando en cuenta que el cultivo de agave azul presenta grandes problemas, el uso de herramientas de ingeniería genética son una buena forma para el mejoramiento vegetal además de la falta de trabajos realizados se puede realizar una contribución importante para este mejoramiento del *Agave tequilana* y su proceso de producción.

## **4. Objetivos.**

### **4.1 Objetivo general**

Analizar la influencia de diferentes concentraciones del metanosulfonato de etilo aplicado a diferentes tiempos de inmersión sobre la formación de brotes en callos de *Agave tequilana*.

### **4.2 Objetivos específicos**

Evaluar el método de desinfección descrito por Valenzuela et al (2006) para desinfectar los meristemos de *Agave tequilana*, para obtener explantes asépticos.

Evaluar el efecto del 2,4 D a 0.5 mg/L para inducir callos en el cultivo de meristemos de *Agave tequilana*.

Evaluar el efecto del metanosulfonato de etilo a 15, 30 y 45 mM por 1, 2 y 3 h de inmersión sobre la formación de brotes en callos de *Agave tequilana*.

## **5. Hipótesis**

Los callos de *Agave tequilana* tienen capacidad de generar brotes a una concentración y tiempo de exposición de metanosulfonato de etilo específico.

## **6. Marco Teórico.**

### **6.1 Generalidades.**

El género *Agave*, cuyo significado es “noble” o “admirable”, fue dado conocer por Carlos Linneo en 1753. Dicho género comprende aproximadamente 200 especies, de las cuales el 75 % se encuentran en México, lugar considerado el centro de origen. Junto con el frijol y el maíz, el agave fue una de las primeras plantas cultivadas en Mesoamérica y gracias a su gran cantidad de usos, es también considerado como el “árbol de la vida” (Rodríguez-Garay B, 2004).

### **6.2 Clasificación taxonómica y descripción.**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida (Monocotiledóneas)

Subclase: Liliidae

Orden: Liliales

Familia: Agavaceae

Género: *Agave*

Subgénero: *Agave*

Sección: Rigidae

Especie: *Agave tequilana* Weber



**Figura 1.** *Agave tequilana* Weber variedad azul

Se caracteriza por su difícil determinación taxonómica ya que existen autores que no reconocen al género *Agave* dentro de la familia *Agavaceae*, sino lo incluyen dentro de la familia *Amarylidaceae* o la familia *Liliaceae*. Por otro lado, la clasificación propuesta por Dahlgren es la más aceptada pues ha sido basada en análisis morfológicos y moleculares; en ella Daghler considera que la familia *Agavaceae* incluye 8 géneros con 295 especies, de los cuales 125 especies (75 %) se encuentran en México (Rodríguez-Garay B, 2004).

### **6.3 *Agave tequilana* Weber 1902 (Weber)**

Planta suculenta que se extiende radicalmente de 1.2 a 1.8 m de longitud, su tallo es grueso, corto de 30 a 50 cm. de altura al madurar. Las hojas de 90 a 120 cm lanceoladas, acuminadas de fibras firmes, casi siempre rígidamente estiradas, cóncavas de ascendentes a horizontales; lo más ancho se encuentra hacia la mitad de la hoja, angosta y gruesa hacia la base, generalmente de color glauco azulado a verde grisáceo. El margen es recto a ondulado o retando, los dientes generalmente de tamaño regular y espaciados irregularmente, en su mayoría de 3 a 6 mm de largo a la mitad de la hoja. Los ápices delgados, curvos o flexos desde poca altura de la

base piramidal de color café claro a oscuro, de 1 a 2 cm de largo, raramente larga achatada o abiertamente surcada de arriba, la base ancha, café obscura decurrente o no decurrente. La inflorescencia es una panícula de 5 a 6 ms de altura, densamente ramosa a lo largo, con 20 a 25 umbelas largas difusas de flores verdes y estambres rosados. Flores de 68 a 75 mm de largo con bractéolas (Hoja que nace del pedúnculo de las flores de ciertas plantas, y suele diferir de la hoja verdadera por la forma, la consistencia y el color.) sobre los pedicelos de 3 a 8 mm de longitud. Ovario de 32 a 38 mm de largo, cilíndrico con cuello corto, inconstricto (amplio), casi terminado en punta sobre la base, un tubo floral de 10 mm de ancho, funeliforme (con forma redonda) surcado, los pétalos desiguales de 25 a 28 mm de longitud por 4 mm de ancho, lineares, erectos pero rápidamente flojos en antesis, cambiando entonces a color café y secos.

Filamentos de 45 a 50 mm de longitud, dobladas hacia adentro junto al pistilo, insertos de 5 a 7 mm cerca de la base de tubo; anteras de 25 mm de largo. El fruto es una cápsula ovalada a brevemente cúspida (Ruiz *et al.*, 1999).

#### **6.4 Distribución**

Este género se distribuye a lo largo del continente americano en zonas que van desde los 40 grados latitud norte hasta los 20 grados latitud sur. Al norte se encuentra presente en zonas áridas y semiáridas de Norteamérica y México, bajando por las islas del Caribe hasta Colombia y Venezuela. En la cuenca Europea del Mediterráneo fueron introducidas con fines ornamentales, posteriormente se dispersaron fuera de los cultivos y actualmente se encuentran naturalizados (Rodríguez-Garay B, 2004).

#### **6.5 Regiones productoras**

Se establece como territorio de origen el comprendido por la totalidad de los municipios en donde se cultiva el agave del Estado de Jalisco; en el Estado de Guanajuato, los municipios de Abasolo, Ciudad Manuel Doblado, Cuerámaro, Huanímaro, Pénjamo, Purísima del Rincón y Romita. Los municipios de Briseñas de

Matamoros, Chavinda, Chilchota, Churintzio, Cotija, Ecuandureo, Jacona, Jiquilpan, Maravatío, Nuevo Parangaricutiro, Numarán, Pajacuarán, Peribán, La Piedad, Régules, Los Reyes, Sahuayo, Tancítaro, Tangamandapio, Tangancícuaro, Tanhuato, Tingüindín, Tocumbo, Venustiano Carranza, Villamar, Vistahermosa, Yurécuaro, Zamora y Zináparo, del Estado de Michoacán. Los municipios de Ahuacatlán, Amatlán de Cañas, Ixtlán, Jala, Xalisco, San Pedro de Lagunillas, Santa María del Oro y Tepic, del Estado de Nayarit y del Estado de Tamaulipas, los municipios de Aldama, Altamira, Antigua de Morelos, Gómez Farías, González, Llera, Mante, Nuevo Morelos, Ocampo, Tula y Xicoténcatl (Ruiz *et al.*, 1999).

Aunque el *Agave tequilana* se adapta a un amplio rango altitudinal, parece favorecerle el intervalo que va de 1,000 a 2,200 msnm. En altitudes inferiores a 1,000 m, el desarrollo inicial del cultivo es rápido y prometedor, por lo que sitios con estas características tienen potencial para la producción de planta, no así para la producción de «piña», ya que ésta, aunque puede adquirir un volumen considerable, generalmente y bajo un manejo convencional, no adquiere las características deseables y requeridas por la industria del tequila, sobre todo en cuanto a la concentración de azúcares se refiere (Ruiz *et al.*, 1999; Vargas, 2004).

En altitudes superiores a 2 200 msnm, la velocidad de desarrollo del cultivo se reduce significativamente y el riesgo de daño por bajas temperaturas y/o heladas se incrementa de manera significativa (Ruiz *et al.*, 2003; Vargas, 2004).

## **6.6 Precipitación, humedad ambiental y del suelo**

El agave prospera bajo un régimen de precipitación anual de 700 a 1 000 mm y una atmósfera de seca a moderadamente seca la mayor parte del año (Ruiz *et al.*, 1999). Sin embargo, Vargas (2004) señala un intervalo óptimo de lluvia acumulada anual de 600 a 1 800 mm. Las regiones productoras de agave más importantes, localizadas en el Estado de Jalisco, México, presentan una precipitación anual que va de 700 a 1 100 mm (Ruiz *et al.*, 1998; Flores *et al.*, 2003; Ruiz *et al.*, 2003b).

## 6.7 Temperatura

El *Agave tequilana* es una planta que presenta pobre tolerancia a las bajas temperaturas, en comparación con la mayoría de especies de la familia Agavaceae (Nobel, 1998; Nobel, 1988). La absorción celular se reduce a la mitad cuando las temperaturas descienden al nivel de -6 °C. Por esta razón el *A. tequilana* probablemente no puede cultivarse en regiones donde, aun ocasionalmente, se presenten temperaturas de -7 °C o inferiores. Por otro lado, la hoja de este agave puede tolerar temperaturas hasta de 55 °C (Nobel *et al.*, 1998).

Dado que es una planta MAC, el agave es muy sensible a las temperaturas nocturnas. La asimilación de CO<sub>2</sub> se favorece con temperaturas diurnas/nocturnas de bajas a moderadas y disminuye drásticamente en ambientes donde, sobre todo, las temperaturas nocturnas son elevadas. En estas condiciones también se incrementa la respiración (Nobel *et al.*, 1998; Pimienta *et al.*, 2000).

## 6.8 Luz

El *Agave tequilana* es una especie que se comporta mejor cuando se presentan días soleados la mayor parte del año, por lo que en una localidad en la que se pretenda introducir este cultivo, el periodo de lluvias no deberá ser muy prolongado. Aunque la cantidad de luz, expresada en flujo de fotones fotosintéticos, constituye un factor ambiental limitante para la fotosíntesis en plantas MAC (Nobel, 1988).

## 6.9 Suelo

Los agaves prefieren suelos de textura media, por ejemplo suelos francos, franco-arenosos o franco-arcillosos. Aunque en zonas con baja precipitación, los agaves prefieren suelos con mayor retención de humedad, es decir suelos de textura pesada, como arcillosos o limo-arcillosos, pero pueden desarrollarse adecuadamente en suelos delgados o profundos. Además, el género *Agave* presenta tolerancia de ligera a intermedia a sales y prospera mejor en un rango de



pH de 6.0 a 8.0; y no son recomendables suelos con problemas de acidez o alcalinidad para su cultivo (FAO, 1994).

## **6.10 Reproducción del *Agave tequilana* Weber variedad azul**

La selección del *Agave tequilana* Weber variedad azul, dentro de los agaves mezcaleros se inició durante el siglo XIX, con base en la preferencia por la menor duración de su ciclo para madurar; por el gusto de los tequileros hacía el producto obtenido a partir de su procesamiento; por su mayor producción de azúcar e hijuelos; así como por su menor contenido de fibra, lo que facilita el proceso. El uso de esta variedad se hizo obligatorio durante el siglo pasado, al emitirse la Norma Oficial Mexicana para la producción de tequila. Dicha norma especifica la variedad azul de *Agave tequilana* como la única autorizada para elaborar tequila.

La planta de *Agave tequilana* Weber variedad azul se reproduce por las vías sexual y asexual:

### **6.10.1 Reproducción sexual**

En el ciclo sexual se realiza la propagación por semilla, para obtener nuevas plantas individuales con las características que presentan los genes propios de los gametos masculinos y femeninos. En la reproducción por semillas puede esperarse que se presente variación genética o segregación entre las plantas hijas.

La floración de agave ocurre cuando se presenta la emisión del escapo floral o quiote, indicando el final de su ciclo de crecimiento, al ser ésta una especie con crecimiento determinado y un solo punto de emisión de hojas. Dentro del cultivo del agave para la producción de tequila, normalmente se elimina el escapo floral cuando inicia su crecimiento, para evitar que la planta consuma los azúcares acumulados en el tallo o piña. El empleo del método de propagación por semilla en el género *Agave* implicaría problemas por variación genética al estar sujeto a polinización cruzada y por dificultades para mantener un abasto ordenado, debido a lo

prolongado del ciclo de crecimiento, que toma de 6 a 8 años para alcanzar la etapa de floración y producción de semilla. Los estudios realizados con semillas muestran también una viabilidad baja de las mismas.

### **6.10.2 Reproducción asexual**

La reproducción asexual es aquella que no involucra el proceso sexual, la reproducción vegetativa de varios tipos de plantas ocurre tanto a partir de hojas como de tallos y raíces, obteniéndose con mayor frecuencia resultados positivos con los tallos. Los individuos obtenidos mediante este tipo de reproducción constituyen un clon y estos clones, a excepción de mutaciones naturales, son genéticamente idénticos a la planta madre. La selección y mantenimiento de cultivares en cultivos frutales se realiza por este método, transfiriendo los tejidos por medio de injertos. Entre las diferentes formas de reproducción asexual se encuentran: La reproducción por bulbillos, rizomas (hijuelos); el empleo de esquejes, acodos e injertos; y los métodos de propagación masiva en laboratorios de cultivo de tejidos.

Para la propagación de *Agave tequilana* Weber variedad azul, existen los siguientes métodos de multiplicación asexual:

### **6.10.3 Bulbillos**

Son plántulas producidas a partir de meristemos de la planta madre, por lo cual son clones de la misma, que al completar su desarrollo caen al suelo, donde desarrollan raíces y crecen como plantas independientes. Este fenómeno se presenta en algunos agaves que desarrollan bulbillos a partir de los meristemos axilares de la inflorescencia, en la base de las flores. El agave azul posee esta característica.

Este método de propagación presenta desventajas por ocurrir después de la floración, tras el ciclo completo de producción del agave. También puede ocurrir que al desarrollarse los bulbillos se propaguen las enfermedades que pudieran existir en

la planta madre. Aunado a estos problemas, el costo es mayor que cuando se propaga por hijuelos rizomatosos. Por estas razones no es un método utilizado con frecuencia.

#### **6.10.4 Rizomas (hijuelos)**

Los rizomas son tallos subterráneos que crecen generalmente en un plano horizontal, paralelo a la superficie del terreno. A diferencia de las raíces, los rizomas poseen yemas en la cara superior de donde se originan hojas y partes aéreas que conformarán una nueva planta y por la cara inferior generan raíces adventicias. Cada año los rizomas emiten yemas que originan nuevos órganos aéreos.

La propagación por rizomas es la más utilizada en agaves, no sólo porque conserva las características genéticas de la planta madre, sino porque el desarrollo de las plantas es más rápido y vigoroso que por bulbillos. Plantas producidas por micropropagación

Las técnicas de micropropagación o propagación *in vitro* tienen la ventaja de producir grandes cantidades de plantas en espacios relativamente reducidos durante todo el año. Para la propagación *in vitro* es necesario que las plantas sean capaces de regenerar. La habilidad de regeneración está determinada por el genotipo, las condiciones ambientales (fuente de nutrimentos, reguladores y condiciones físicas) y el estado de desarrollo de la planta. Las técnicas más comunes de micropropagación son la proliferación de yemas axilares, la organogénesis y la embriogénesis somática. La propagación *in vitro* permite controlar la condición sanitaria de las plantas a lo largo de su producción y constituir grupos de plantas de la misma edad para su manejo agrícola. Este procedimiento permite reproducir en gran número plantas provenientes de individuos seleccionados con base en características fenotípicas y realizar un programa de mejoramiento genético a través de propagación clonal.

### **6.10.5 Sistema de propagación del Agave tequilero mediante hijuelos**

El manejo común de la propagación del agave en la DOT corresponde a un manejo tradicional basado en conocimiento empírico aplicado para optimizar la producción de hijuelos y consiste en las siguientes prácticas:

1. Preparación y producción de hijuelos.
2. Elección de planta madre.
3. Selección del hijuelo.
4. Transporte de hijuelos.

La tecnificación del cultivo de agave sigue un patrón hacia la homogeneidad de las plantaciones, que en la actualidad se controla solamente con la selección de tamaño de la “cabeza” del hijuelo.

#### **1. Preparación y producción de hijuelos**

Los intensos laboreos de preparación de los suelos para las plantaciones realizados con maquinaria agrícola en los predios o plantaciones que lo permiten, favorecen la creación de una estructura que aumenta la captación y almacenamiento de humedad y facilita el crecimiento de rizomas y la brotación de “hijuelos” hacia la superficie del suelo. Algunos agricultores o productores repiten la práctica del subsoleo antes de la época de lluvias con la intención de producir más “hijuelos”. Si el objetivo es desarrollar “hijuelos” de buena calidad (peso y volumen), se suspenden las labores al suelo en cuanto éstos han emergido. Si la demanda de hijuelos desciende, los productores “desbotan” (deshijan) mecánicamente las plántulas en cualquier edad de la plantación. La diferencia fundamental entre el “arranque” y el “desbote” es el interés sobre los “hijuelos”, si se van a plantar o a destruir.

La mejor edad de las plantas para generar hijuelos es entre los 3 y 5 años cuando se obtienen hijuelos más viables para las nuevas plantaciones.

## **2. Elección de las plantas madre**

En la elección de las plantas madres se tiene que considerar: a. Edad de la planta madre: que la planta tenga entre 3 y 5 años de establecida en el predio, etapa en la cual la planta madre está en pleno desarrollo vegetativo y en mejores condiciones de poder alimentar a los hijuelos que emergen.

## **3. Selección de hijuelos**

La selección de los hijuelos es una de las etapas más importantes para el establecimiento de la plantación ya que de esto depende en gran medida la calidad de la misma. En la selección de los hijuelos son varias las etapas a realizar:

### **3.1 Arranque de los hijuelos**

a. Condiciones del terreno: es importante conocer las condiciones en que se encuentra el terreno donde se va a realizar el arranque del hijuelo, ya que esto determinará las dificultades de la práctica y el tiempo y cantidad de arrancadores necesarios para llevarla a cabo. Dentro de los aspectos a considerar está la topografía del terreno, si es plano, ladera, suelto o compacto, con pedregosidad superficial o interna, presencia de maleza o sin ella, si la densidad de plantación es alta o baja.

b. Arranque del hijuelo: debe realizarse con un implemento conocido como barretón, que es una placa metálica, que sirve para cortar el rizoma que une al hijuelo con la planta madre. Este corte se realiza de un solo golpe mediante un corte limpio y transversal al rizoma.

### 3.2 Selección y clasificación de los hijuelos arrancados

La selección de los hijuelos afectará la calidad de la plantación y por consiguiente, la producción de la materia prima para el tequila y el beneficio económico que se obtenga de la cosecha. Una planta puede producir durante su vida hasta 15 plántulas o hijuelos de diferentes calidades. Bajo un buen manejo agrícola una plantación de 4 años, puede producir en promedio 3 hijuelos de primera, (1.5 a 3 kg) y 6 de segunda (0.5 a 1.5 kg) por cada planta madre.

a. Selección de los hijuelos: Esta acción la debe realizar un técnico o agricultor capacitado ya que de esta acción depende el éxito o el fracaso de las plantaciones. Se deben considerar los hijuelos más vigorosos, sanos, de color azul intenso, los que están más retirados de la planta madre, y que no muestran rastros de insectos.

Clasificación de los hijuelos. Se debe hacer con base en los siguientes puntos.

- Verificar que la planta madre sea de la variedad azul.
- Verificar que la plantación esté dentro de la DOT.
- Verificar que la plantación esté registrada ante el CRT.
- Verificar que los hijuelos provengan de plantas madres de la misma edad.
- Conocer el historial de manejo de la plantación y origen del material de la plantación original.
- Determinar el tamaño del hijuelo (que sea uniforme). Para medir este aspecto el agricultor se basa en el tamaño de las hojas, que puede ser de media vara a vara completa (de 0.40 a 0.85 m). Para estimar el tamaño de la piña se toma como referencia los tamaños de frutas, limón, mandarina, naranja, toronja y piña

### **3.3 Desinfección de hijuelos arrancados y herramientas**

a) Los hijuelos preparados deben de bañarse con una solución desinfectante inmediatamente después del tostoneo y antes de ser clasificados. Se puede utilizar una solución de hipoclorito de sodio al 10 por ciento aplicada por aspersion a las zonas de corte en la base de la planta y en las hojas.

b) Toda la herramienta utilizada para el arranque y la preparación de los hijuelos (coas, barretones, machetes y talaches) debe ser desinfectada con una solución de Cloro al 10 por ciento, posterior al arranque de 100 hijuelos, al menos cada vez que se cambia de predio de trabajo y/o cuando se esté trabajando en plantaciones de dudosa sanidad, ya que existe la posibilidad de trasladar fuente de inóculo (bacterias, hongos y nematodos).

### **4. Transporte de hijuelos**

Es necesario evitar el daño a los hijuelos durante las labores de transporte entre los predios de arranque, centros de acopio y predios de nueva plantación. Para ello se deben de tomar las medidas siguientes:

a) Desinfectar la caja del camión antes y después de cada carga de hijuelos, así como desinfectar las llantas con Hipoclorito de sodio antes y después de entrar a una plantación de agave.

b) No pisotear los hijuelos ya cargados en el camión.

c) No provocar demasiadas heridas a los hijuelos.

d) Si el hijuelo presenta heridas originadas por la poda, insectos, no se recomienda someter al hijuelo a la presión del herbicida glifosato, una vez establecido en el predio.

## 6.11 Enfermedades bióticas

Las enfermedades causadas por organismos vivos o parasitarios afectan considerablemente la producción agrícola. Para que éstas ocurran los requisitos básicos son:

- Hospedante o planta susceptible.
- Patógeno virulento presente.
- Condiciones ambientales favorables (Agrios, 1978; García, 1982).

### 6.11.1 Marchitez

El agente causal de esta enfermedad es el hongo *Fusarium oxysporum*. La marchitez que se presenta en el cultivo de agave se debe a una deshidratación de los tejidos y esto se da a su vez porque hay una reducción, muerte o destrucción del sistema radical, o bien porque hay destrucción o taponamiento de haces vasculares (Castañeda-Vásquez, 2002).

Aunque esta enfermedad era observada en plantaciones de agave mayores de 3 años, actualmente se le encuentra en plantas de un año. En plantaciones nuevas su síntoma es el característico “clavo”.

En general, en casi cualquier planta de agave de la cual se tomen algunas muestras de raíz, se aislará a *Fusarium sp* aunque la planta no manifieste síntoma alguno, esto es debido a que este hongo es habitante natural del suelo, además de ser un parásito facultativo, o sea que puede sobrevivir en materia orgánica sin que haya un hospedante establecido (Timmer, 1982). Es más probable que penetre a las raíces por medio de heridas a que penetre de manera natural. Con el incremento de la marchitez, las hojas se encarrujan y se secan, la planta se arranca muy fácilmente (Jones *et al*, 1989).





**Figura 2.** Fotografía de *Agave tequilana* Weber variedad azul enferma de Marchitez

Es importante conocer los principales factores que pueden inducir una marchitez en las plantas, para saber qué métodos o prácticas pueden ser empleadas para prevenir o reducir la incidencia de la misma, así con el manejo del cultivo no se busca eliminar a *Fusarium sp* de los suelos donde se cultive el agave, sino mantenerlo en un grado tal que no provoque daños de importancia económica, esto es, que no provoque síntomas significativos que afecten el desarrollo o bien que llegue a provocar la muerte de las plantas.

Para el caso de marchitez, es poco útil el uso de fungicidas con base en cobre, debido principalmente a que el problema se presenta en raíz y no en follaje. Aunque se ha visto (pruebas de laboratorio) que el sulfato de cobre pentahidratado tiene efectividad contra *Fusarium sp*, cuando ataca raíz es muy difícil que alcance la concentración necesaria para su eliminación, y más aún si se supone que pueda haber infectado alguna raíz y ya se encuentre dentro de la planta (Soltero, 2002). Otro aspecto a considerar es que el cobre es un elemento que en altas concentraciones es inhibidor de la emisión de nuevas raíces, se utiliza en algunos viveros para dirigir las raíces en una misma dirección dentro del cepellón).

### 6.11.1.2 *Fusarium oxysporum*

*Fusarium oxysporum* es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas. Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio papa- dextrosa agar (PDA) a 25°C. La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar y pocas microconidias y una de tipo pionotal con la formación de poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidias. El hongo produce tres clases de esporas: Microconidias: Esporas generalmente unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales cilíndricas, rectas o curvadas; se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados. Las microconidias tienen 5-12  $\mu\text{m}$  de largo por 2.5- 3.5  $\mu\text{m}$  de ancho (Nelson, 1981).

Macroconidias: Esporas de paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; las macroconidias tiene un tamaño de 27 a 46  $\mu\text{m}$  de largo por 3.0 a 4.5  $\mu\text{m}$  de ancho (Nelson, 1981).

Clamidosporas: Esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias, de paredes gruesas. Se forman simples o en pares, terminales o intercalares: poseen un tamaño de 5 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro (Nelson, 1981). Gracias a ellas el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedante.

Hasta el momento no se conoce la fase perfecta del hongo (Nelson *et al.*, 1983).

## **6.11.2 Medidas de control de la marchitez**

### **Uso de planta sana**

Establecer una plantación utilizando hijuelo o planta sana tiene muchas ventajas, ya que hay mayor probabilidad de prendimiento de los hijuelos y establecimiento de las plantas, así como un desarrollo más adecuado invariablemente se ha aislado *Fusarium sp*, presentan marchitez después de tres o cuatro años de haber sido plantados (Aceves, 2003).

Para reducir riesgos de seleccionar planta enferma, se debe arrancar hijuelo de predios que no tengan plantas enfermas, o bien evitar aquellas que presenten síntomas de marchitez o clorosis, esto porque es posible que si hay infección en la planta madre, entonces haya un contagio de hijuelos por el rizoma. Después de arrancar el hijuelo, desinfectar la herramienta con que se esté llevando a cabo la labor, para reducir la diseminación de la enfermedad.

Al preparar el hijuelo (tostonear), se deben eliminar aquellos que presenten clavo o daño por insectos; además de desinfectarlos por medio de inmersión con en fungicidas a base de cobre.

Aunque trabajos de campo en otros ambientes indican que la inmersión de los hijuelos en la solución reduce la tasa de rendimiento de la planta en campo, por lo que es preferible una aspersion manual con sulfato de cobre.

### **Aplicación de materia orgánica**

La aplicación de materia orgánica es sumamente importante debido a que da una mejor estructura al suelo, además de que funciona como un buffer que evita cambios de pH y en general hace más disponibles muchos nutrientes así como proporcionar otros elementos necesarios para las plantas (Rojas, 1993).

Debido a que la materia orgánica es un sustrato para microorganismos que la descomponen, esto permite incrementar las poblaciones de los mismos y muchos de estos son organismos antagónicos a diversos patógenos del suelo, o incluso pueden ocupar espacios que antes estarían disponibles únicamente para los fitopatógenos (Fückikovsky, 2000).

La materia orgánica que se aplique debe ser incorporada para evitar pérdidas por viento o por lavado, además lo que se persigue al aplicar materia orgánica es mejorar el suelo que se encuentra alrededor de la zona radical, ya que es la zona que interesa tener en mejores condiciones, tanto para mejorar la disponibilidad de nutrimentos como para favorecer el desarrollo toneladas por hectárea de composta como materia orgánica, aplicadas en los surcos, antes del trasplante de plantas.

### **Aplicación de cal**

Cuando se tienen suelos ácidos, la aplicación de cal permite balancear el pH de los mismos. Muchos nutrimentos que se encuentran en el suelo, o que se adicionan a suelos ácidos no pueden ser tomados por las plantas debido a que se fijan por efecto del pH, pero al agregar cal éstos se hacen más disponibles (Tisdale y Werner, 1996).

Se sabe que *Fusarium sp* puede desarrollarse mejor cuando se tiene un pH ácido en el suelo, alrededor de 5 a 5.5, así que si se aplica cal se torna más desfavorable el ambiente para el desarrollo de este hongo (Fückikovsky y Velásquez, 2001).

Cuando se aplica cal, se tienen mejores resultados en la regulación del pH si ésta es incorporada, ya que el intercambio de cationes se da a nivel de la raíz, permitiendo así que la planta pueda absorber los nutrientes. Cuando se aplica en forma superficial sin que sea incorporada, puede reaccionar mientras se va incorporando por efecto de la lluvia, y al llegar al nivel de la raíz ya no da el efecto regulador de pH que se esperaba.

En suelos de origen ácido, ya sea por el material parental, o por las condiciones climáticas, es importante aplicar cal al inicio de cada temporada de lluvias, para permitir una mejor disponibilidad de los nutrientes, así como para mantener un suelo más estable.

### **6.12 Cultivo de tejidos vegetales**

El cultivo de células y tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales in vitro, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos (Street 1977, Calva y Ríos 1999). Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl y Paul 2000).

### **6.13 Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática se define como el proceso por el cual las células somáticas haploides o diploides se desarrollan en plantas diferenciadas pasando por las etapas características embriológicas sin que exista la fusión de gametos (Litz, 1993).

La producción de embriones somáticos a partir de células, tejidos y cultivo de órganos puede ocurrir directa o indirectamente. El método directo involucra la formación de un embrión asexual a partir de una célula individual o un grupo de células de una parte del tejido del explante, sin pasar por la fase de callo (tejido nuclear de cultivares cítricos poliembriónicos). En el método indirecto se utiliza un estado intermedio de desarrollo de callo o un cultivo de suspensión de células durante el cual se induce un cambio en la potencialidad de las células mediante el uso de auxinas, que posteriormente se retiran y se induce la formación de embriones (Hartmann y Kester, 1998).

Por embriogénesis somática, originada directamente en explantes de nucelas o de callos, se han regenerado cultivares poliembriónicos y monoembriónicos de *Citrus* y de mango (*Mangifera indica*) y especies monoembriónicas de manzana (*Malus domestica*), *Ribes rubrum* y *Vitis vinífera* (Dodds y Roberts., 1982).

#### **6.14 Organogénesis *in vitro***

La organogénesis *in vitro* puede suceder directamente de yemas axilares preexistentes o bien de *novo* dando lugar a la formación de estructuras adventicias (brotes o raíces) a partir de tejido ya diferenciado no meristemático. La obtención de estos brotes puede ser de manera directa o indirecta. En la primera se pueden formar brotes en el explante, sin la formación de callo. La segunda se refiere a la inducción de callos a partir de los cuales se forman brotes y raíces. La organogénesis *in vitro* ha sido ampliamente usada en la biotecnología vegetal tanto para la micropropagación, transformación genética y estudios del desarrollo vegetal (Zhang y Lemaux, 2004).

La organogénesis *in vitro* depende de la aplicación exógena de hormonas, en particular auxinas y citocininas y también de la habilidad del tejido para responder a los estímulos hormonales durante el cultivo (Zhang y Lemaux, 2004).

En general, se reconocen tres fases para que se lleve a cabo la organogénesis; en la primera, las células del explante adquieren la competencia. En la segunda, las células competentes son canalizadas y determinadas para la formación de un órgano específico bajo la influencia de hormonas vegetales, y en la tercera, la morfogénesis continúa independientemente del suministro de fitohormonas (Sugiyama, 2000).

Está plenamente comprobado que ocurren modificaciones genéticas en las células y los tejidos cultivados *in vitro*. Muchas de estas modificaciones se manifiestan como mutaciones heredables a las progenies de las plantas regeneradas. Este fenómeno se conoce como variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981).

## 6.15 Variación somaclonal

El mejoramiento genético a escala celular *in vitro* ofrece ventajas importantes, como la eliminación de los efectos del medio ambiente y la facilidad para manejar un gran número de individuos en un espacio reducido. Las células vegetales pueden ser modificadas genéticamente mediante diferentes metodologías y entre ellas podemos enumerar: fusión de protoplastos, variación somaclonal (espontánea o inducida), producción de haploides y biobalística. Una vez que se produce la modificación genética es necesario seleccionar las células que expresen el carácter de interés, para luego llevarlas a desarrollarse en una planta completa mediante la embriogénesis somática.

La variación somaclonal es una respuesta de la planta al ambiente que le produce el cultivo *in vitro*, el cual engloba la percepción del estrés por parte del tejido, la señal interna, la activación de factores de transcripción en respuesta, la reprogramación genética y el cambio en las características de las proteínas y el metabolismo. Debido a que el cultivo de tejidos es un proceso no natural, la planta está de continuo expuesta a una combinación de factores que en lo habitual no tiene en el cultivo normal (Cassells *et al.*, 2003).

Las alteraciones en la carga cromosómica de las plantas originadas a través de cultivo de tejidos, pueden deberse al reducido control sobre la mitosis, uso de reguladores de crecimiento y otros componentes del medio de cultivo, incluso las propias condiciones ambientales del cultivo así como la inestabilidad del genotipo.

Los cambios fenotípicos en las plantas micropropagadas, pueden ser a causa de una variación temporal que es reversible y transmitida de una generación a otra de células durante el cultivo *in vitro*, pero no por vía sexual, que pueden producirse en las plantas cambios estables pero no heredables. Estos cambios son llamados variación epigenética (George, 1993; Skirvin *et al.*, 1994). Una diferencia importante entre la variación genética y la epigenética, es que la primera sucede al azar y con

menor frecuencia que la segunda; además, que las mutaciones genéticas son estables y heredables. Las características producidas por variación epigenética pueden transmitirse de una manera estable por mitosis, pero raras veces por meiosis; y el nivel de inducción de características epigenéticas es influida de manera directa por la presión de selección que se realice en las células (Skirvin *et al.*, 1994).

### **6.16 Alteraciones genéticas producidas durante el cultivo de tejidos**

La posibilidad de alteraciones a nivel del ADN puede ocurrir a consecuencia de diferentes estreses ambientales, dependiendo de la intensidad del estrés y del estado de diferenciación de las células serán los cambios genómicos que se produzcan. Algunas de las alteraciones genéticas pueden ser mutaciones puntuales, cambios en la estructura o el número de cromosomas y activación de elementos genéticos transponibles. Estos últimos causan reorganizaciones moleculares, no solo por su transposición, sino también porque generan amplificaciones y deleciones.

En el caso de un callo, la dediferenciación que se produce durante la inducción del mismo provoca en las células una serie de procesos genéticos que resultan en reordenamientos genómicos que podrían dar lugar a fenotipos alterados (Kaepler y Phillips, 1993).

### **6.17 Agentes mutágenos**

Existen muchas sustancias con capacidad mutagénica, sin embargo los más utilizados con fines prácticos son los denominados supermutágenos, entre ellos varios agentes alquilantes y la azida sódica, que pueden aumentar varios cientos de veces las tasas de mutación espontánea.

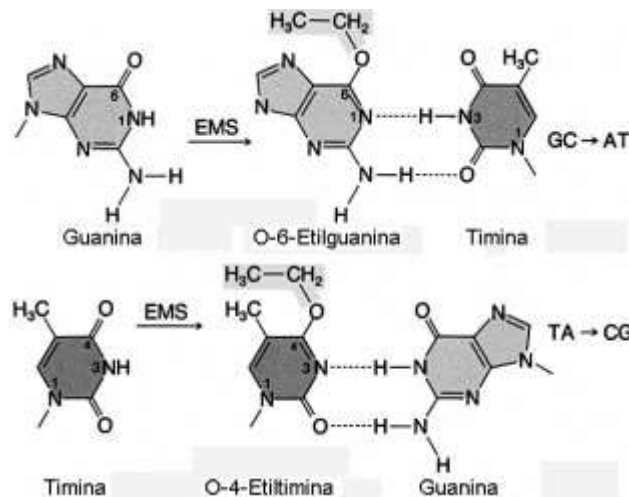
En la actualidad, el mejoramiento genético mediante inducción de mutaciones utiliza básicamente dos tipos de agentes mutágenos: los químicos metanosulfonato de



etilo (MSE), N-metil-N-nitrosourea (MNH), sulfato de dietilo (dES) etc. y los físicos (rayos x, rayos gamma, etc.). Los agentes mutágenos químicos son numerosos y continuamente se están incrementando. La mayoría de ellos pertenecen al grupo de los agentes alquilantes, denominados así por incorporar grupos alquilo a las macromoléculas y dentro de ellos se pueden señalar los siguientes: MSE, dES y los compuestos nitrosos como MNH (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Con respecto a los mutágenos químicos, el MSE ( $C_3H_8O_3S$ ) es un agente mutagénico de tipo alquilante que puede transferir radicales etilo a las bases nitrogenadas, especialmente a guaninas. La adición ocurre, en general, en el oxígeno 6 de esta base, dando lugar a la forma anormal O-6-etil-guanina. Durante la replicación, la ADN polimerasa no reconoce esta forma modificada de guanina e introduce timina como base complementaria en vez de citosina. De este modo, un par G:C acaba convirtiéndose, tras dos replications, en uno A:T, induciendo la aparición de dichas transiciones GC→AT con una tasa de  $10^{-4}$  a  $10^{-2}$  por gen (Griffiths, 1996).

El MSE ocasiona mutaciones puntuales (Luan *et al.*, 2007), con efectos pleiotrópicos (que afecta a múltiples características del fenotipo), mostrando modificaciones en más de un carácter, quizás en parte porque dichas mutaciones ocurren en diferentes *loci* (posición fija en un cromosoma) (Basu *et al.*, 2008). Figura 3



**Figura 3.** Acción del agente mutágeno MSE a nivel de ADN

## 6.18 Estudios sobre la aplicación de metanosulfonato de etilo (MSE) en diversos cultivos

En caña de azúcar se han obtenido variaciones somaclonales resistentes a *Fusarium sacchari* exponiendo los callos embriogénicos al mutágeno químico metanosulfonato de etilo (MSE). Las plantas tolerantes y resistentes a *F. sacchari* se obtuvieron mediante el tratamiento de callos con 32 mM MSE durante 4 h, exponiéndolos a 100 ppm de cultivo filtrado de *F. sacchari* en la fase de germinación de embriones. Esta tolerancia de las plantas se confirmó en ensayos de invernadero por inoculación con *F. sacchari* (Mahlanza *et al.*, 2013).

Se han reportado mutaciones inducidas de camote (*Ipomoea batatas* L.) tolerantes a salinidad, utilizando metanosulfonato de etilo (MSE). A partir de callos de explantes de hojas los cuales se trataron con 0,5% MSE para 0, 1, 1,5, 2, 2,5 y 3 h y 200 mM de NaCl. Los resultados sugirieron que los mutantes son más tolerantes a sal que las plantas control (Luan *et al.*, 2007).

En líneas de plátano de Brasil (*Musa spp.*, AAA) se combinó el sistema de microsección transversal con la mutagénesis in vitro inducida por metanosulfonato de etilo (MSE) para detectar las plantas resistentes al marchitamiento por *Fusarium*. Los resultados indicaron que la concentración óptima de MSE y la duración para el tratamiento de micro-secciones transversales fueron 300 mM y 60 min, respectivamente (Luan *et al.*, 2007).

En Limón Rough (*Citrus jambhiri* Lush.) se realizó un estudio para inducir tolerancia a salinidad. Se llevaron a cabo mutaciones por métodos físicos (rayos gamma) y por métodos químicos exposición con metanosulfonato de etilo y metanosulfonato de metilo (MSE y MMS). Para la mutagénesis física, se utilizaron callos de 40 y 60 días de edad, estos fueron irradiados con rayos gamma (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 Gy). La mutagénesis química se llevó a cabo en callos de 45 y 60 días de edad, fueron expuestos con los mutágenos (MSE y MMS) a diferentes concentraciones

(0,1, 0,2, 0,3 y 0,4%). Basándose en la supervivencia y el potencial de regeneración, se observó 10-20 y 20-30 Gy como las dosis óptimas de los rayos gamma en los callos de 40 y 60 días de edad, respectivamente. Para la mutagénesis química, la dosis más adecuada para callos de 45 días de edad fue de (MSE y MMS) fue de 0,1% cada uno, mientras que los callos de 60 días de edad no presentó ninguna regeneración después del tratamiento con mutágenos. Para la selección *in vitro* de mutantes y variables somaclones contra el estrés salino, se utilizó NaCl como agente selectivo a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 75, y 100 mM) se mantuvo en este medio por 170 días. Se obtuvieron somaclonales tolerantes a sal en el intervalo de 25-100mM (Kumar *et al.*, 2010).

En cultivares de *Asteracantha longifolia* L., explantes de hojas fueron tratadas con MSE y se sembraron en medio MS, adicionado con BA (8.8  $\mu$ M) y NAA (2.69  $\mu$ M). Obteniéndose un total de 24 mutantes, 4 mutantes enanos, 7 mutantes de hojas, y 13 mutantes de flores, se analizaron morfológicamente, revelando una variación significativamente en la altura de la planta (18.6 a 42.3 cm), el número de inflorescencia de (4 a 10), en el color de la flor de blanco a violeta, y contenido en fitosteroles (0,033 a 0,0467 mg/g). Los análisis moleculares se llevaron a cabo mediante análisis RAPD, se utilizaron 30 cebadores generaron 185 productos amplificados, de los cuales, 86 (46.73%) fueron polimórficos en la naturaleza (Motilal *et al.*, 2012).

## **7. Materiales y métodos**

### **7.1 Ubicación del experimento**

El trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales el cual se encuentra localizado en el Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.

### **7.2 Material biológico**

Se colectaron plantas de *Agave tequilana* Weber variedad azul en el Instituto Tecnológico de Tlajomulco el cual se encuentra localizado en Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco durante el mes de Agosto del 2013, y se trasladaron al laboratorio de cultivo de tejidos vegetales localizado en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

### **7.3 Condiciones de trabajo**

El manejo del material se realizó dentro de la campana de flujo laminar en condiciones de asepsia, y se mantuvieron en condiciones in vitro dentro de una cámara bioclimática a 21°C con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8h de oscuridad.

#### **7.1 Desinfección de meristemos**

Los meristemos fueron desinfectados en campana de flujo laminar, sumergiéndolos en una solución de Agrimicin (PFIZER, México) al 0.5%(m/v) y Captan (PFIZER, México) 0.5%(m/v) por 20 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril para eliminarle el exceso de Agrimicin y captan, posteriormente los explantes se lavaron con una solución de etanol al 70% (v/v) por 5 minutos seguido de tres lavados con agua destilada estéril, y se colocaron en una solución de cloro al 40%(v/v) por 20 minutos, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril, estos meristemos fueron nuevamente lavados en una solución de cloro al 10%(v/v) por 10 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, después se le adiciono una solución de Cloruro de Mercurio al 0.1% por 10 minutos y se lavó 3

veces con agua destilada estéril, para finalizar los meristemos fueron lavados con Hipoclorito de Calcio al 3%(m/v) por 20 minutos y se enjugaron 3 veces con agua destilada estéril, después de este proceso de desinfección los meristemos fueron sembrados en medio de cultivo MS (Murashige and Skoog,1962).

## **7.2 Preparación de medios semisólido y líquido**

El medio utilizado fue el medio MS (Murashige and Skoog,1962) constituido por: Sales MS (4.3g/L), sacarosa (30g/L), myoinositol (100 mg/L), fosfato de sodio (50 mg/L), vitaminas (10 ml/L), phytigel (2.5 g/L) para el medio semisólido ajustando el pH a  $5.7\pm 1$ .y se esterilizó a 15 libras por 15 minutos (Cañas M, 1993) este medio fue para el tratamiento control. Para promover el desarrollo de callos *in vitro* se preparó el mismo medio MS suplementado con 2,4-D (0.5mg/L) a un pH de  $5.7\pm 1$ . La esterilización se realizó a 15 libras por 15 minutos.

El medio liquido consistió de Sales MS (2.15g/L), sacarosa (15g/L), myoinositol (50 mg/L), fosfato de sodio (25 mg/L), vitaminas (5 ml/L), añadiéndole respectivamente las concentraciones del MSE a un pH de  $5.7\pm 1$ .y se esterilizó a 15 libras por 15 minutos el cual se utilizó para exponer los callos al MSE, este mismo se utilizó para el enjuague de los callos después de los periodos de inmersión.

## **7.3 Inducción de callos**

Los meristemos previamente desinfectados fueron colocados en medios semisólido MS libre de reguladores de crecimiento durante una semana; posteriormente para inducir la formación de callos fueron transplantados en medio semisólido MS suplementado con 0.5 mg/L de 2,4-D, con resiembra cada 30 días.

#### 7.4 Evaluación del efecto del mutágeno en callos de *Agave tequilana*

El cuadro 1 muestra los factores y niveles codificados y reales que se utilizaron para evaluar el tiempo y la concentración de MSE sobre la formación de brotes en callos de *A. tequilana*. Estos valores sirvieron para realizar el diseño experimental del proyecto

**Cuadro 1**

Factores y niveles para el diseño de experimentos.

	FACTOR					
	T (h)			MSE (mM)		
V. Codificado	-1	0	1	-1	0	1
V. Real	1	2	3	15	30	45

El diseño experimental se muestra en el cuadro 2. Callos con 16 semanas fueron colocados en los diferentes tratamientos con MSE. Después de transcurrido el tiempo de inmersión, los callos fueron lavados con medio líquido estéril y posteriormente colocados en medio MS semisólido sin reguladores, por 30 días.

## Cuadro 2

Diseño experimental para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de metanosulfonato de etilo a diferentes tiempos de inmersión.

Tratamiento	Tiempo de inmersión (H)	MSE mM
Control	0	0
1	1	15
2	1	30
3	1	45
4	2	15
5	2	30
6	2	45
7	3	15
8	3	30
9	3	45

### 7.5 Análisis estadístico de datos

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza y comparación de medias según prueba de Tukey ( $p \leq 0.5$ ) en un diseño de superficie de respuesta para determinar si hubo diferencia estadística significativa en cuanto al número de brotes producidos por callo.

## 8. Resultados

### 8.1 Desinfección de los meristemas

El protocolo de desinfección fue altamente eficiente ya que se obtuvo un 100% de meristemas libres de contaminación como podemos verlo en la figura 5.

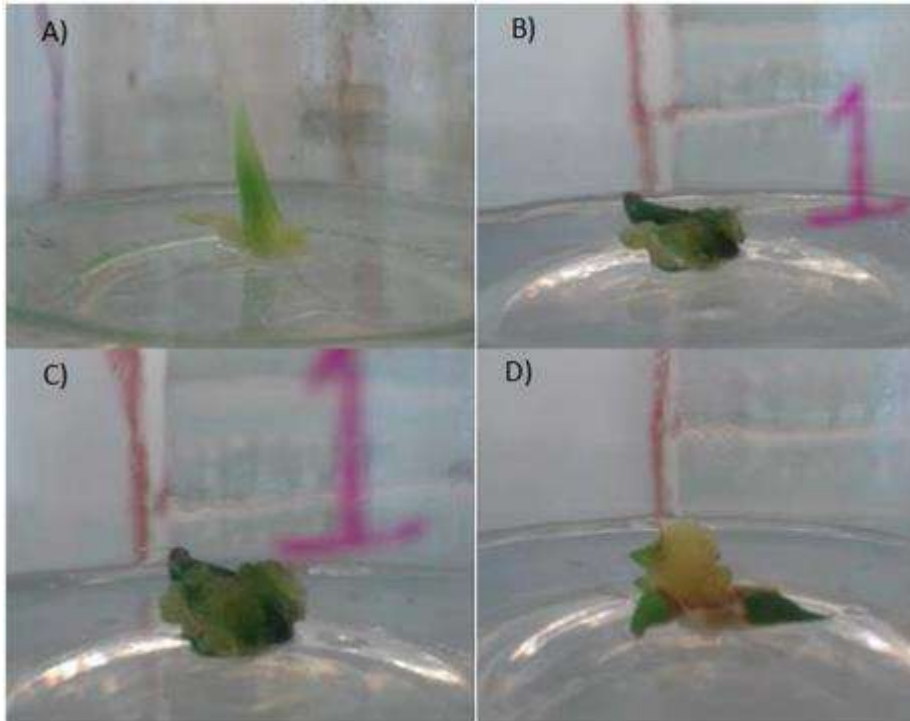


**Figura 5.** Meristemo de cogollo de *Agave tequilana* después de una semana del tratamiento de desinfección.



## 8.2 Inducción de callos

La formación de callos se observó a los 30 días de inducción alcanzando el máximo de formación de callos a los 120 días de cultivo (figura 6).



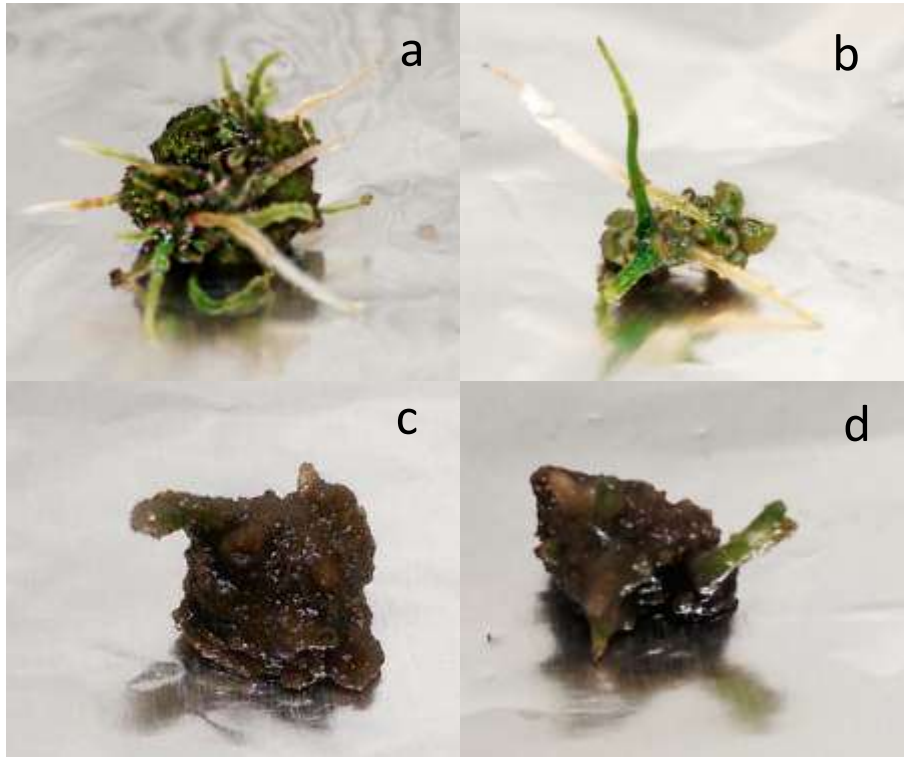
**Figura 6.** Inducción de callo de *Agave tequilana* Weber variedad azul. A) Meristemo proveniente del cogollo, B) Formación del callo observado a los 30 días de inducción, C) Crecimiento del callo a 60 días de cultivo, D) Callo después de 120 días. El medio utilizado fue MS suplementado con 2,4-D 0.5 mg/L, con resiembra cada 30 días.

### **8.3 Evaluación del efecto del mutágeno en callos de *Agave tequilana* Weber variedad azul.**

Callos de 120 días de inducción fueron tratados con el agente mutágeno MSE a diferentes concentraciones (15, 30 y 45 mM) durante una, dos y tres horas de inmersión. Como se observa en las figuras 7,8 y 9 la concentración de MSE y el tiempo de inmersión fueron determinantes en el proceso de formación de brotes de los callos, ya que a mayor tiempo de inmersión y concentración de MSE los callos presentaron un cambio en su color, antes de ser expuestos a los tratamientos presentaban un color verde, después de 7 días de haber sido tratados con el mutágeno los callos presentaron una mayor oxidación y una posterior necrosis perdiendo la capacidad de generar brotes.

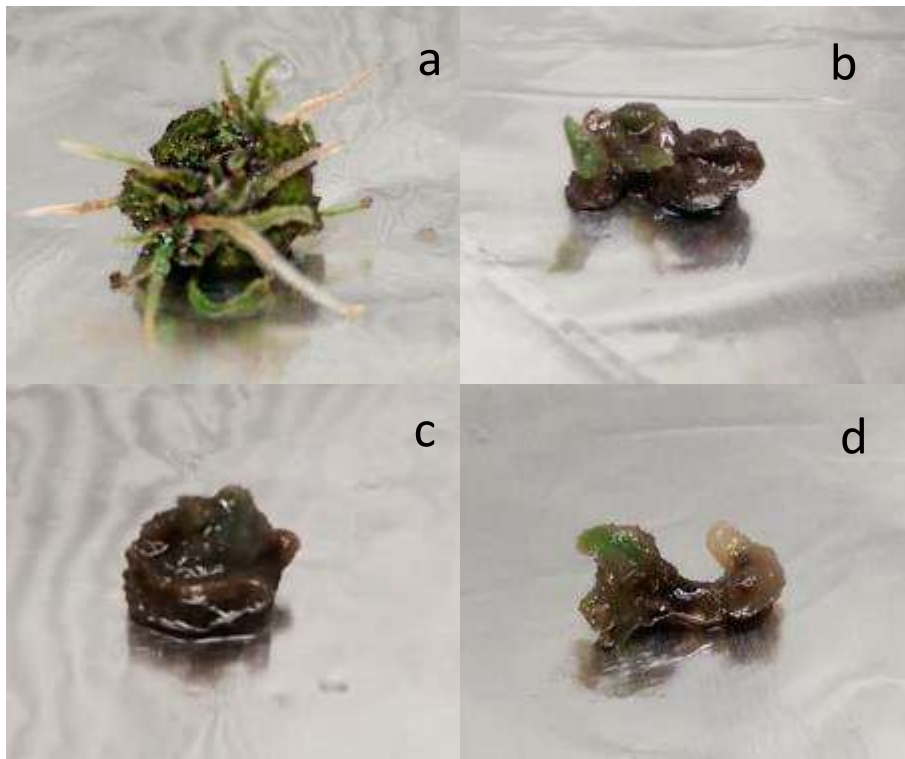
En todos los casos cuando se compararon los tratamientos con el control este presento el mayor número de formación de brotes (16 brotes por callo) Fig 7-a, 8-a y 9-a.

Sin embargo todos los callos expuestos a 1 h de inmersión con el MSE y una concentración de 15mM, fue el único tratamiento que a pesar de presentar una oxidación los callos no perdieron la capacidad para la formación de brotes (fig. 7-b).



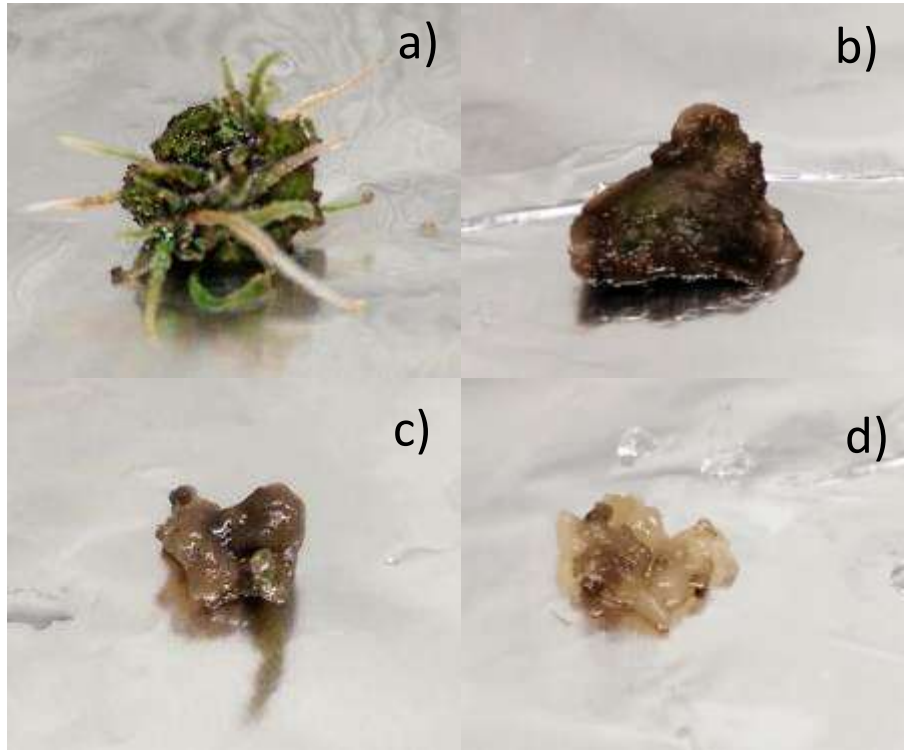
**Figura 7.** Callos de *Agave tequilana* Weber variedad azul tratados con MSE por una hora de inmersión. A) Control, B) 15mM de MSE, C) 30mM de MSE, D) 45mM de MSE, a los 30 días posteriores a la exposición del mutágeno.

Para los callos tratados con 2h de inmersión los que fueron tratados con 15 mM de MSE presentaron una mayor formación de brotes (3 brotes por explante) figura 8-b. seguido del tratamiento con 45 mM de MSE que presentó una respuesta de 1 brote por explante, ambos tratamientos se caracterizaron por tener una baja respuesta en la formación de brotes con respecto al tratamiento control.



**Figura 8.** Callos de *Agave tequilana* Weber variedad azul tratados con MSE por dos horas de inmersión. A) Control, B) 15mM de MSE, C) 30mM de MSE, D) 45mM de MSE, a los 30 días posteriores a la exposición del mutágeno.

El tratamiento en el cual el tiempo de inmersión fue de 3 h fue al más agresivo para los callos ya que independientemente de la concentración de MSE todos los callos presentaron necrosis. (Fig. 9), perdiendo la capacidad total de generar brotes.



**Figura 9.** Callos de *Agave tequilana* Weber variedad azul tratados con MSE por tres horas de inmersión. A) Control, B) 15mM de MSE, C) 30mM de MSE, D) 45mM de MSE, a los 30 días posteriores a la exposición del mutágeno.

Los factores evaluados en estos tratamientos fueron el tiempo de inmersión y la concentración de MSE sobre la capacidad de generación de brotes en callos de *Agave tequilana* Weber variedad azul, el análisis estadístico mostró que todos los callos expuestos al agente mutágeno se vieron afectados en su capacidad de generación de brotes como se muestra en el cuadro 3, así mismos el análisis estadístico indico que el tiempo fue el factor más influyente sobre la capacidad de formación de brotes.

**Cuadro 3**

Numero de brotes obtenidos de *Agave tequilana* Weber variedad azul después de 30 días de la exposición de callos al MSE

Tratamiento	Concentración de MSE mM	Tiempo de inmersión (h)	N° Brotes
1	15	1	8±1.53 <sub>b</sub>
2	30	1	2±1.0 <sub>c</sub>
3	45	1	4±0.57 <sub>c</sub>
4	15	2	3±0.58 <sub>c</sub>
5	30	2	0 <sub>c</sub>
6	45	2	1±0.25 <sub>c</sub>
7	15	3	0 <sub>c</sub>
8	30	3	0 <sub>c</sub>
9	45	3	0 <sub>c</sub>
Control	0	0	16±2.08 <sub>a</sub>

\*Se realizó análisis de varianza y comparación de medias según prueba de Tukey ( $p \leq 0.5$ ) tratamientos con letras diferentes son estadísticamente significativas.

En el cuadro 4 se presenta el análisis de varianza con los resultados presentados en el cuadro 3, se observa que el factor tiempo de inmersión fue el que tuvo un efecto estadístico significativo sobre el número de brotes. La concentración del MSE no ejerció influencia sobre el número de brotes. Se encontró que los datos experimentales se ajustan a un modelo cuadrático con una correlación de 90.8%.

**Cuadro 4**

Análisis de varianza realizado de acuerdo al diseño de superficie de respuesta, implementado para evaluar que factor ejerció un efecto estadísticamente significativo ( $p \leq 5$ ) el tiempo de inmersión y la concentración de MSE

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Ti	32.6667	1	32.6667	18.38	0.0233
B:MSE	6.0	1	6.0	3.38	0.1635
AA	2.0	1	2.0	1.13	0.3667
AB	4.0	1	4.0	2.25	0.2306
BB	8.0	1	8.0	4.50	0.1240
Error total	5.33333	3	1.77778		
Total (corr.)	58.0	8			

La ecuación 1 es la ecuación de superficie de respuesta, es decir el modelo matemático que nos sirve para predecir cuantos brotes producirá un callo tratado con diferentes concentraciones de MSE a diferentes tiempos de inmersión, la ecuación incluye términos de los efectos individuales de cada factor, términos de la interacción entre los factores y términos cuadráticos de ambos factores. Se observa que los términos individuales son negativos, la interacción es positiva y los términos cuadráticos de los dos factores son positivos.

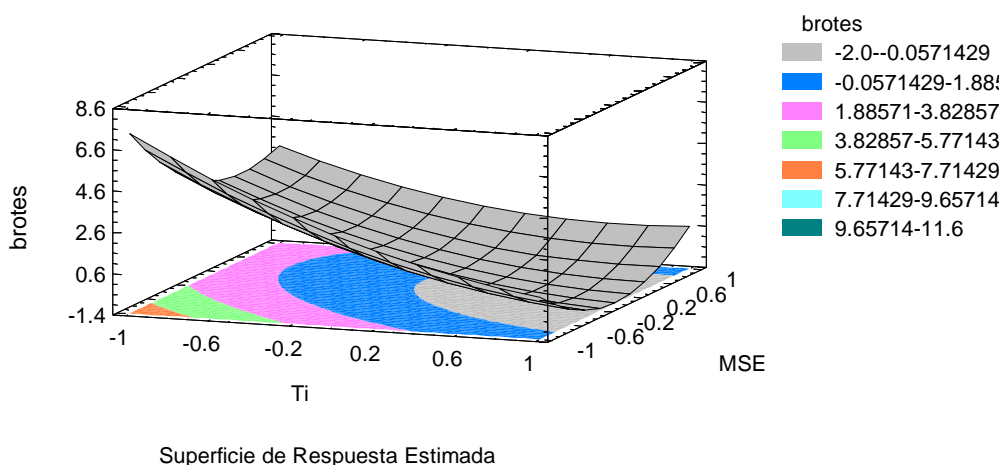
Ecuación 1

Ecuación de superficie de respuesta para predecir número de brotes, en base a la interacción entre el tiempo de inmersión y la concentración de MSE.

$$brotos = 0.0 - 2.33333 * Ti - 1.0 * MSE + 1.0 * Ti^2 + 1.0 * Ti * MSE + 2.0 * MSE^2$$

La ecuación nos permite predecir que los valores óptimos que se pueden utilizar para maximizar el número de brotes son de 1 h de inmersión con 15mM de MSE, lo cual nos permitirá obtener un máximo de 7.3 brotes por explante.

En la figura 10 se presenta el diagrama de superficie de respuesta que relaciona la interacción entre el tiempo de inmersión y la concentración de MSE. En esta figura se corrobora que los valores óptimos para maximizar el número de brotes son los valores más bajos de cada factor. La gráfica de contorno colocada debajo de grafica de superficie de respuesta nos ayuda a identificar cuantos brotes obtendríamos al utilizar diferentes tiempos de inmersión y concentraciones de MSE en el rango de valores experimentales utilizados en el trabajo.



**Figura 10.** Diagrama de superficie de respuesta de la interacción entre el tiempo de inmersión y la concentración de MSE sobre la formación de brotes en callos de *Agave tequilana* Weber variedad azul.

Con la finalidad de evaluar si el mejor tratamiento obtenido con el diseño experimental utilizado fue diferente estadísticamente con el tratamiento control que fueron callos sin la exposición del MSE, se realizó una comparación de medias que se presenta en el cuadro 5, se observa que la comparación entre los dos tratamientos (entre grupos) fue estadísticamente significativa ( $p \leq 5$ ) y que la



homogeneidad de los resultados en las repeticiones (intra grupos) fue alta debido a que el cuadrado medio del error tuvo un valor muy bajo en comparación con el cuadrado medio del error entre grupos.

**Cuadro 5**

Análisis de varianza para determinar comparar los resultados del tratamiento óptimo (1h de inmersión con 15 mM de MSE) con el tratamiento control (sin la exposición al MSE).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	104.167	1	104.167	39.06	0.0033
Intra grupos	10.6667	4	2.66667		
Total (Corr.)	114.833	5			

En el cuadro 6 se presenta la comparación de medias entre el tratamiento control y el tratamiento óptimo. Se observa que el tratamiento control indujo una mayor producción de brotes. Estos resultados confirman que la inmersión de los callos en el MSE induce cambios que hacen que los callos pierdan capacidad para desdiferenciarse por lo tanto no puedan formar brotes en la cantidad que lo haría sin el mutágeno.

**Cuadro 6**

Comparación de medias entre el tratamiento óptimo (1h de inmersión con 15 mM de MSE) con el tratamiento control (sin la exposición al MSE).

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Óptimo	3	7.3	B
Control	3	15.3	A
DMS (0.05)		3.7	

## 9. Discusión.

En la etapa de adaptación *in vitro*, lo primero que se debe lograr es establecer que el explante se encuentre en condiciones de asepsia por lo cual se debe de eliminar principalmente la contaminación superficial, en este trabajo el método utilizado fue el de Valenzuela que mostro una alta eficiencia ya que se obtuvo un 100% de desinfección de los explantes utilizados.

Se logró la formación de callos de *Agave tequilana* utilizando meristemas como explante y 0.5 mg/L de 2,4-D como regulador de crecimiento vegetal. Este resultado es importante porque concuerda con lo reportado por (Valenzuela-Sanchez *et al.*, 2006) quien evaluó diferentes tipos de explantes para la formación de callos siendo el meristemo el cual presentó el mayor índice en la inducción de callo, en otros trabajos se ha reportado que uno de los explantes más utilizados son las hojas (Portillo, Santacruz-Ruvalcaba, Gutierrez-Mora, and Rodriguez-Garay, 2007), pero se necesita de mayor número de reguladores de crecimiento tanto citocininas (BA, TDZ, 2ip y KIN) como auxinas (2,4 D) lo que genera que el protocolo se vuelva más costoso. Lo que evidencia una vez más que en nuestro trabajo el haber utilizado meristemo como fuente de explante fue la mejor opción debido a que se logró obtener a partir de él, y con tan solo, él 2,4 D como regulador de crecimiento la formación de callos, se ha reportado que el 2,4 D es uno de los mejores reguladores de crecimiento para la inducción de callos en diversas especies como se reporta en trabajos realizados en trinitaria (Rashmi and Trivedi, 2014), en tomillo se ha reportado que el 2,4 D y la KIN mejora la respuesta de formación de callos (Nordine *et al.*, 2014) y en el caso del bastón de emperador que una vez que se adiciono 2,4D al medio la formación de callos fue evidente (Gomes-Dias, *et al.*, 2014).

Todos los tratamientos a los que los callos de *Agave tequilana* Weber variedad azul fueron tratados a diferentes tiempo de inmersión y concentración de MSE se vieron afectados en su capacidad para la generación de brotes. Estos resultados pudieran deberse a que el mutágeno provoca metilaciones las cuales generan que un par

G:C acaba convirtiéndose, tras dos replicaciones, en uno A:T, induciendo la aparición de dichas transiciones GC→AT (Griffiths, 1996), estos cambios en las pares de bases nucleotídicas provoca mutaciones las cuales pueden afectar diferentes procesos físicos, bioquímicos y moleculares en la célula vegetal. Provocar mutaciones puntuales utilizando agentes químicos es una herramienta biotecnológica para la generación de resistencia a diferentes patógenos que atacan a especies de importancia comercial. Se ha reportado trabajos con *Saccharum officinarum* en donde a través de la utilización del MSE se han obtenido plántulas resistentes a *Fusarium sachari* (Mahlanza *et al.*, 2013) y así mismo se reportó trabajos de *Musa spp* tolerantes a *Fusarium oxysporum* (Bhagwat y Duncan, 1998).

Aunque existen muy pocos reportes en cuanto a la respuesta en la formación de brotes de callos después de la aplicación de un mutágeno, Bhagwat y Duncan (1998) reportaron que al incrementar la concentración de MSE y el tiempo de exposición al mutágeno se observa una disminución en la sobrevivencia en callos de *Musa spp*, esto debido probablemente al daño celular que ocasiona el agente mutagénico MSE.

## 10. Conclusiones.

El método reportado por Valenzuela et al., 2006 fue efectivo para lograr la desinfección de los meristemas utilizados como explantes.

Se pudo lograr la inducción de callos utilizando 2,4 D como regulador de crecimiento vegetal a una concentración de 0.5mg/L

Se comprobó que el tiempo de inmersión fue el factor estadísticamente significativo para obtener callos con capacidad de formación de brotes. Los callos tratados con 15 M de metanosulfonato de etilo con un periodo de inmersión de una hora son los que fueron capaces de formar brotes (7.3 brotes/explante) a los 30 días.

Este trabajo es pionero ya que por primera vez se está reportando, que se puede inducir la formación de brotes a partir de callos de *Agave tequilana* después de haberse tratado con el mutágeno MSE, lo cual puede ser el inicio de un programa para obtener líneas celulares que pueden tener características agronómicas deseables como resistencia a diferentes plagas y/o enfermedades.

## 11. Bibliografía.

- Aceves, R. J. J. (2003). Prevención y manejo integral de la marchitez del *Agave tequilana* Weber var. Azul en Jalisco. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo experimental Altos de Jalisco. Folleto Técnico No. 1. 62 p.
- Agrios, G, N. 1978. Plant pathology. Second edition. Academy Press. Inc. London, NW I. P. 325-327.
- Basu SK, Acharya SN y Thomas JE (2008). Genetic improvement of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) through MSE induced mutation breeding for higher seed yield under western Canada prairie conditions. *Euphytica*, 160, 249-258.
- Bhagwat, B. and Duncan, E. J. (1998) Mutation breeding of Highgate (*Musa acuminata*, AAA) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using , chemical mutagens. *Scientia Horticulturae*, 73, 11 – 12.
- Calva C. G., Rios L. E. (1999). Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología. pp 267-301.
- Cañas M. (1993). Metodologías in vitro de Vegetales. Ediciones VIS. Bucaramanga-Colombia. pag: 50-54
- Cassells, A.C., S.M.Joyce, E.A. O'Herlihy, M.J. Pérez-Sanz y C.Walsh. 2003. Stress and Quality in In Vitro Culture. *Acta Hort.* 625:153-164, ISHS.
- Castañedas-Vázquez, H. 2002. Aislamiento e identificación de microorganismos responsables de la marchitez del agave tequilero. pp. 21-24. In Flores-López, H.E. (ed). Análisis agroecológico del *Agave tequilana* Weber var. Azul con énfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco, INIFAPCIRPAC.C.E. Altos de Jalisco, Publicación especial No. 1. Tepatitlán, Jalisco, México.
- Cedeño, M.C., (1995). Tequila production. *Critical Reviews in Biotechnology* 15, 1–11.
- Consejo Regulador del Tequila, (2006). Estadísticas del CRT. <http://www.crt.org.mx>, Cited 12 July 2006.
- Dodds JH y Roberts LW (1982). *Experiments in Plant Tissue Culture*. (pp. 178) Cambridge: Cambridge University Press.
- FAO. 1994. ECOCROP 1. The adaptability level of the FAO crop environmental requirements database. Versión 1.0. AGLS. FAO. Rome, Italy.
- Ferl, R., Paul A. L. (2000). Genome organization and expression. En: Buchanan B., Grisse W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.

- Flores L., H. E., J. A. Ruiz C., R. A. Martínez P., D. R. González E. y L. Nava V. (2003). Determinación del potencial productivo de especies vegetales para el estado de Jalisco: Distrito de Desarrollo Rural 066 Lagos de Moreno. Folleto Técnico Núm. 2. INIFAP-CIRPAC-C.E. Altos de Jalisco. Tepatitlán, Jal. México. 54 p.
- Fuckikovsky, L. Z. y M. J. Velásquez. 2001. *Agave tequilana* Weber var. Azul y su Manejo. p. 17 In Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Fitopatología. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Campus Querétaro. Santiago de Querétaro, Qro. Del 15 al 18 de julio del 2001.
- Fuckikovsky. L. Z. 2000. La tristeza y muerte del *Agave tequilana* Weber var. Azul (TMA) y los microorganismos e insectos importantes relacionados. pp. 90. In Memorias del XXVII Congreso Nacional de Fitopatología. Puerto Vallarta, Jalisco, México. Del 9 al 13 de julio del 2000.
- García, R. E. 1982. Apuntes del curso de Fitopatógenos del suelo. Colegio de Postgraduados. Chapingo, Texcoco, Edo de México. 50 p.
- Gentry, H.S. (1982). *Agaves of Continental North America*. Tucson, AZ: University of Arizona Press. 670 pp.
- George EF (1993). *Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology*, pp. 574. England: Exegetics, Limited.
- Gil Vega, K. C. 1997. Caracterización de *Agave* sp. Utilizando marcadores moleculares. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN, México.
- Gomes-Dias, G. D. G., Almendagna-Rodrigues, F., Rodrigues-Soares, J. D., Pasqual, M., & de Carvalho, A. (2014). Embryogenic Induction of *Torch ginger* (*Etilingera elatior*) Callus. [Article]. *Agrociencia*, 48(2), 173-184.
- Griffiths JF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC y Gelbart WM (1996). *An Introduction to Genetic Analysis* (6 Ed.). New York.: W. H. Freeman & Company.
- Gutiérrez A, Santacruz F, Cabrera J y Rodríguez B (2003). Mejoramiento genético vegetal in Vitro. (vols. 1 (1), 1-19), México: e-Gnosis.
- Hartmann HT y DE Kester (1998). *Techniques of in vitro culture of micropropagation*. In: *Plant Regeneration Principles and Practices* H. Hartmann T.,D. Kester. (6th ed., pp: 549-608). Prentice Hall New Hersey.
- Jones, J.P., A.. W. Engehady, and S.S. Woltz. 1989. Management of *Fusarium* wilt of Vegetables and Ornamentals by Macro- and Microelement Nutrition. pp.18-32. In Engelhard, A.W. Ed., *Soilborne Plant Pathogens: Management of Diseases with Macroelements*, St. Paul, Minnesota, USA. The American Phytopatological Society.
- Kaeppler SM y Phillips RL (1993). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 29, 125-130.

- Kumar K. A., Narayani, M., Subanthini, A. and Jayakumar, M (2011) Antimicrobial activity and phytochemical analysis of citrus fruit peels – utilization of fruit waste. *International Journal of Engineering Science and Technology* 3, 5414 – 5421.
- Larkin PJ y Scowcroft WR (1981). Somaclonal variation: A novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theoretical Applied Genetics*, 60, 197-214.
- Litz RR (1993). Organogenesis and somatic embryogenesis. *Acta Horticulture*, 336, 199-205
- Luan YS, Zhang J, Gao XR y An LJ (2007). Mutation induced by ethylmethanesulphonate (MSE), in vitro screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 88, 77-81.
- Mahlanza T, Rutherford RS, Snyman SJ y Watt MP (2013). In vitro generation of somaclonal variant plants of sugarcane for tolerance to *Fusarium sacchari*. *Plant Cell Reports*, 32, 249–262
- Martínez, R. J. L., Vázquez, G. M., Pimienta, B. E., Bernal, M. F., Flores, M. F., Ibarra, D. R., Torres, M. P., Cuevas, C. H., Martín del Campo, M. N., Rodríguez, R. R. y Virgen, C. G. (2004). Proyecto: Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Rev. Mex. Fitopatol.* 16 (1): 116.
- Motilal, L. A., Zhang D., et al. 2012, Microsatellite fingerprinting, Trinidad Accession and plot information, *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 1 – 9
- Nelson, P.E.; Toussoun, T.A. and Cook, R.J. 1981. *Fusarium*, Diseases, Biology, and Taxonomy. University Park and London, U.S.A. The Pennsylvania State University Press. 457pp.
- Nelson, P.E.; Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park. 193pp.
- Nobel, P. S. (1988). *Environmental Biology of Agave and Cacti*. Cambridge University Press, New York, 270p.
- Nobel, P.S. (1998). *Remarkable Agaves and Cacti*. New York: Oxford University Press. 166 pp.
- Nordine, A., Tlemcani, C. R., & El Meskaoui, A. (2014). Regeneration of plants through somatic embryogenesis in *Thymus hyemalis* Lange, a potential medicinal and aromatic plant. [Article]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(1), 19-25. doi: 10.1007/s11627-013-9577-x
- Pimienta B., E., J. Zañudo, E. Yepez, E., and P.S. Nobel. (2000). Seasonal variation of net CO<sub>2</sub> uptake for cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) and pitayo

- (*Stenocereus queretaroensis*) in a semiarid environment. *Journal of Arid Environments* 44: 73-83.
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutierrez-Mora, A., & Rodriguez-Garay, B. (2007). Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. [Article]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(6), 569-575. doi: 10.1007/s11627-007-9046-5
  - Rashmi, R., & Trivedi, M. P. (2014). Effect of Various Growth Hormone Concentration and Combination on Callus Induction, Nature of Callus and Callogenic Response of *Nerium odorum*. [Article]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(5), 2562-2570. doi: 10.1007/s12010-013-0693-1
  - Robert, M. L.; Herrera, J. L.; Chan, J. L. y F. Contreras. 1992. Micropropagation of *Agave* spp. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 19:306-329
  - Rodríguez-Garay B.(2004) La materia prima *Agave tequilana* weber var. Azul. Consejo Regulador del Tequila. México.
  - Rodríguez-Garay, B., Lomelí-Senci3n, J.A., Tapia-Campos, E., Guti3rrez-Mora, A., Garc3a-Galindo, J., Rodr3guez-Dom3nguez, J.M., Urbina-L3pez, D., Vicente-Ram3rez, I., (2008). Morphological and molecular diversity of *Agave tequilana* Weber var. Azul and *Agave angustifolia* Haw. var. Linnen3 o. *Ind. Crops Prod.* 29, 220–228.
  - Rojas, G. M. 1993. *Fisiolog3a vegetal aplicada*. Cuarta edici3n. Editorial Interamericana. Mc. Graw Hill. M3xico, D. F. p. 55.
  - Ruiz C., J. A., G. Medina, I. J. Gonz3lez, C. Ortiz, H. E. Flores L., R. A. Mart3nez y K. F. Byerly. (1999). Requerimientos agroecol3gicos de cultivos. Libro T3cnico N3m. 3. INIFAP-CIRPAC. Ed. Conexi3n Gr3fica. Guadalajara, Jalisco, M3xico. 362 p.
  - Ruiz C., J. A., I. J. Gonz3lez A., J. R. Regalado R., J. Anguiano C., I. Vizca3no V. y D. R. Gonz3lez E. (2003)a. Recursos edafo-clim3ticos para la planeaci3n del sector productivo en el Estado de Jalisco. Libro T3cnico N3m. 2. INIFAP-CIRPAC. Ed. Conexi3n Gr3fica. Guadalajara, Jalisco. 172 p.
  - Ruvalcaba RD, Santacruz RF y GB Rodr3guez (2000). Estudios citogen3ticos en *Agave tequilana* Weber variedad azul. En: XVIII Congreso Nacional de Fitogen3tica. Irapuato, Guanajuato, M3xico. pp. 157
  - Skirvin RM, McPheeters KD y Norton M (1994). Sources and Frequency of Somaclonal Variation. *HortScience*, 29 (11), 1232–1237.
  - Soltero-Quintana, R. 2002. Pruebas de patogenicidad del *Fusarium oxysporum* y *Erwinia* sobre plantas de *Agave tequilana* Weber var. Azul in vitro. pp.257-321. In Flores-L3pez, H. E. (ed). An3lisis agroecol3gico del *Agave tequilana* Weber var. Azul con 3nfasis en problemas fitosanitarios en Jalisco. INIFAP. CIRPAC. C.E. Altos de Jalisco. Publicaci3n especial No.1. Tepatitl3n, Jalisco, M3xico.



- Street H. E. (1977). Cell (suspension) cultures techniques. En: Street H. E. (Ed). Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing., Oxford., England. pp. 61-102.
- Sugiyama M (2000). Genetic analysis of plant morphogenesis in vitro. International Review of Cytology, 196, 67-4.
- Timmer, L. W. 1982. Host range and host colonization, temperature effects and dispersal of *Fusarium oxisporum* f. Sp. Citri. Phytopatology. Vol. 72, p 698-702.
- Tisdale, S. y N. Werner. 1996. Fertilidad de los suelos y fertilizantes. Libro técnico. Edit. Unión Tipográfica Hispanoamericana S. A. de C. V. México. 760 p.
- Valenzuela ZA (1994). El agave tequilero: su cultivo e industrialización. Ed. Ágata. México. 119 p.
- Valenzuela-Sanchez, K. K., Juarez-Hernandez, R. E., Cruz-Hernandez, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M. E., & Paredes-Lopez, O. (2006). Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. [Article]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 42(4), 336-340. doi: 10.1079/ivp2006788
- Vargas T., V. M. (2004). Evaluación del potencial agroecológico del cultivo de *Agave tequilana* Weber en el Estado de Jalisco. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara, Facultad de Agronomía. Zapopan, Jalisco. 46 p.
- Zhang S y Lemaux PG. (2004). Molecular analysis of in vitro shoot organogenesis. Critical Reviews Plant Sciences, 23, 325-335.