



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**EFFECTO DEL POTENCIAL HÍDRICO EN LA GERMINACIÓN Y DESARROLLO EN
CONDICIONES *in vitro* Y EVALUACIÓN DE SUPERVIVENCIA EN CONDICIONES
ex vitro DE *Agave celsii* Hook var. *celsii* (AGAVACEAE)**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA PRESENTA:**

NELLY MADALEINE MARTÍNEZ AZPEITIA

DIRECTOR: DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA

**MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO
2008**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
COORDINACIÓN DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE CONTROL ESCOLAR, UAEH

PRESENTE

Por este conducto le comunico que el Jurado asignado a la pasante de Licenciatura en Biología **Nelly Madaleine Martínez Azpeitia** quien presenta el trabajo recepcional de tesis titulado “Efecto del potencial hídrico en la germinación y desarrollo en condiciones *in vitro* y evaluación de supervivencia en condiciones *ex vitro* de *Agave celsii* Hook var. *celsii* (Agavaceae)”, después de revisarlo en reunión de sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE:

M. en C. Miguel Ángel Villavicencio Nieto

PRIMER
VOCAL:

M. en C. Manuel González Ledesma

SEGUNDO
VOCAL:

Dra. Ana Laura López Escamilla

TERCER
VOCAL:

Dr. Ángel Moreno Fuentes

SECRETARIO: **Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval**

PRIMER
SUPLENTE:

Dra. Maritza López Herrera

SEGUNDO
SUPLENTE:

Dr. Arturo Sánchez González

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

Mineral de la Reforma, Hidalgo a 07 de noviembre de 2010

Biol. Ulises Iturbe Acosta
Coordinador Adjunto de la Licenciatura en Biología



LA PRESENTE INVESTIGACIÓN SE REALIZÓ EN EL
LABORATORIO DE MORFOFISIOLOGÍA VEGETAL DEL
CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS DE LA UAEH,
BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ANA LAURA LÓPEZ ESCAMILLA.

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por permitirme llegar a donde estoy.

A los miembros del comité de sinodales:

M. en C. Miguel Ángel Villavicencio Nieto, por las observaciones y aportaciones realizadas al presente escrito.

M. en C. Manuel González Ledesma, gracias por recibirme siempre con una sonrisa amigable, por las observaciones y comentarios.

Dr. Ángel Moreno Fuentes, por interesarse en este trabajo y el apoyo brindado.

Dr. Otilio Acervado Sandoval, por el apoyo y las porras para terminar esta etapa.

Dr. Arturo Sánchez González, por la revisión y comentarios hacia este trabajo.

Dra. Martiza López Herrera, Gracias por todos sus consejos y enseñanzas desde el inicio.

Especialmente quiero agradecer a la Dra. Ana Laura López Escamilla, por la paciencia, las horas de revisión en la madrugada, por enseñarme que todas las cosas son posibles, que solo es necesario un poco de dedicación, empeño y amor a lo que se hace.

Al Maestro en C. Mario Segura Almaraz, por el apoyo fotográfico para la realización de este trabajo, por sus invaluable consejos, por escucharme y apoyarme desde el inicio de esta aventura.

A l Dr. Víctor Manuel Bravo Cuevas, por todo el apoyo brindado en las peripecias ocurridas durante mi formación profesional; al Dr. Gerardo Sánchez y al Biol. Ricardo por las clases de estadística y el interés en este trabajo.

A los compañeritos y amigos del laboratorio, a Irma y Ángeles, por su entusiasmo; a Su, Miriam, Claudia, Beto y Alex, por estar siempre para alegrar las horas de trabajo, hacerme ver mis errores, por las horas de comida y los viernes de danzón, Gracias por estar aquí!!

Agradezco Infinitamente a todas las personas que de manera directa e indirecta influyeron en la realización de esta meta que ahora cumplo, al Prof. Reyes Luna, Lidia, Edgar, Brenda, Dr. Arturo Silva y a la M. en C. Rosario Ramírez Tréjo.

Con todo mi ser gracias a los seres más importantes en mi vida, mis padres **Guillermo y Paula** (los ruidosos), por darme la vida, por toda la comprensión, el apoyo incondicional en mis locuras y sobre todo el amor que siempre me dan, por guiarme hasta ahora, por enseñarme que el valor de las cosas se genera con el trabajo, dedicación y entusiasmo puesto en todo lo que hacemos. Los AMO.

A mis hermanos, Memo yahir y la Pequeña pawis, Mil gracias por estar siempre, apoyarme, escuchar mis problemas y sueños, saben que me tienen incondicionalmente, son una parte muy importante en mi vida.

A Jessy, gracias por el mejor regalo de la vida, por las porras y los ánimos que siempre me das.

Al mejor regalo que la vida me ha dado, mi pequeña Leslie (mi cachorro), por quien todo hago posible, Te amo.

A mis comadres: Are, Bony, Dey, Dalia, Mari, Azu y Angie, gracias por las largas charlas intentando arreglar el mundo, por los cafés jaja. y por las M&#"#\$%&\$\$ terapias que siempre me ayudaron a reaccionar cuando estaba en el hoyo.

A mi tío David, por la confianza y el apoyo incondicional que me da fuerza para seguir realizando las cosas que me propongo.

A mi querida Su-lin, Mil gracias por enseñarme a ver desde otro enfoque la vida, que las penas con tacos de canasta son mejor; por permitirme entrar en el mundo de la familia Zamora Hierro y sobre todo por tener el hombro dispuesto a sostenerme cuando me encuentro mal, te quiero mucho, no lo olvides wera...

A Marisol y Sara, Gracias por compartir conmigo, por su amistad y apoyo las Quiero Mucho mamasas.

A Loreley, por todas las enseñanzas, pláticas y salidas de campo, por hacerme ver el mundo real y sobre todo por brindarme tu confianza y amistad, te quiero bruja. También quiero agradecer a la Bióloga Lidia Artzaga y la Lic. Silvia Peña, por el apoyo, los consejos y las pláticas, Muchas Gracias.

A los compañeros de vivencias y amigos: Alma, chuy, K-ro, Lore, Dianita, Paty, Memo y compañía, Magguiz, Álvaro, Fernando, Mikis, chiquito, Griss, Ming, Pollo y Gabriel, gracias por cuidarme siempre.

A Ángel guardián, que siempre me acompaña, B. L. H. S., te recuerdo con mucho cariño siempre, se que estas con el mejor amigo que podemos tener y que siempre nos mantendrá unidos.

ÍNDICE

Abreviaturas	7
Resumen	8
1. Introducción	9
2. Antecedentes	11
Generalidades de los Agaves	11
Distribución	13
Reproducción de los Agaves	14
Reproducción Sexual	14
Propagación vegetativa	15
Importancia de los Agaves en México	16
<i>Agave celsii</i> Hook var. <i>celsii</i>	18
Distribución y Usos de <i>Agave celsii</i> var. <i>celsii</i> .	20
Las semillas de Agave	22
Cultivo de tejidos	25
Potencial hídrico (Ψ_A)	28
3. Justificación	32
4. Objetivos	33
5. Material y Método	34
Material Biológico	34
Medición del Potencial Hídrico (Ψ_A)	34
Cultivo <i>in vitro</i>	34
Cultivo <i>ex vitro</i>	35
Transferencia <i>ex vitro</i> y sobrevivencia de las plántulas	36

6. Resultados y Discusión	37
Potencial Hídrico (Ψ_A)	37
Germinación	38
Morfología de las plántulas en las diferentes concentraciones de manitol en el medio de cultivo	45
Establecimiento <i>ex vitro</i> y sobrevivencia de las plántulas	48
7. Conclusiones	55
8. Anexo 1	56
9. Anexo 2	57
10. Bibliografía	58

ABREVIATURAS

Ácido sulfúrico	H_2SO_4
Cloruro de sódio	NaCl
Hipoclorito de sódio	NaOCl
Megapascales	MPa
Metabolismo Ácido de Crassuláceas	MAC
Murashige & Skoog	MS
Polietilenglicol	PEG
Potencial de presión	Ψ_p
Potencial gravitacional	Ψ_g
Potencial hídrico	Ψ_A
Potencial mátrico	Ψ_m
Potencial osmótico	Ψ_π
Variedad	var.

RESUMEN

El continente Americano es considerado el centro de origen del género *Agave*, con 200 especies, de las cuales 125 se encuentran en el territorio mexicano, representando más de la mitad de las especies descritas en el continente. Estas plantas se encuentran facultadas para sobrevivir en condiciones climáticas adversas, principalmente originadas por temperatura y sequía; *Agave celsii* Hook. var. *celsii*, forma grupos de rosetas blandas y suculentas de 100 a 120 cm de diámetro, crece sobre peñascos de roca calcárea, donde el efecto de la baja disposición de agua en el sustrato altera la capacidad germinativa de las semillas. El objetivo del presente trabajo es determinar el comportamiento germinativo de las semillas y el desarrollo de plántulas de *Agave celsii* var. *celsii* en condiciones controladas (*in vitro*); utilizando diferentes concentraciones de manitol 0, 75, 85 y 105 g/l, en el medio MS; y evaluar la supervivencia en condiciones controladas (*ex vitro*). Se evaluó el potencial hídrico (ψ_A) de cada concentración, así como la germinación durante 30 días, y supervivencia después de 12 semanas en condiciones controladas *ex vitro*. Obteniendo los potenciales hídricos (ψ_A) de -0.87 -1.58, -1.61, -1.79 Mpa, para 0; 75, 85 y 105 g/l de manitol, se observó que los porcentajes de germinación y supervivencia en condiciones *ex vitro* fueron disminuyendo a medida que se incrementó la concentración de manitol presentando 74.7, 14, 11, 8.3 % en las concentraciones de manitol, con 82.1, 52.8, 36.4 y 5.3 % de supervivencia en condiciones *ex vitro* respectivamente.

1.- INTRODUCCIÓN

Agave es el género más representativo de la familia Agavaceae, es endémico del continente americano con una distribución que se extiende desde el sur de los Estados Unidos de Norte América, hasta Colombia y Venezuela, con el 75% de estas especies distribuidas en México, (García-Mendoza, 2002). Los agaves presentan múltiples adaptaciones a su ambiente natural, incluyendo la reproducción sexual de muchas especies que con la producción de flores, frutos y semillas, como una forma convencional de originar progenie (Nobel,1998); la cual contendrá información genética de los progenitores y puesto a que este tipo de reproducción involucra variabilidad, la información será recombinada, generando una amplia gama de posibilidades de plasticidad fenotípica con nuevas oportunidades de supervivencia y establecimiento de forma individual, sin embargo presentará altos costos energéticos, originando poco éxito poblacional (Rosas, 2002).

El establecimiento de nuevos individuos por la vía sexual es poco frecuente debido a las condiciones extremas de temperatura y disponibilidad de agua, siendo uno de los factores cruciales que modula el crecimiento de las plantas en el estrés hídrico, que se origina cuando la absorción de agua por un cultivo es más baja que la demanda evaporativa de la atmósfera; afectando de manera indirecta la producción y viabilidad de las semillas que una planta puede producir (Maldonado *et al.*, 2002).

Tanto la sequia como la salinidad, son factores importantes para la agricultura y son generadores de estrés hídrico, el cual entre otras cosas, impide a los cultivos desarrollar su potencial genético (Zhu, 2002). Se ha sugerido que varias especies de agaves no presentan reproducción sexual, solo propagación vegetativa la cual puede originarse mediante la formación de hijuelos en la base del tallo y la formación de bulbillos sobre la inflorescencia (Nobel, 1988; Arizaga y Ezcurra, 1995); evento que se presenta con poca frecuencia (Granados, 1999).

Agave celsii Hook. var. *celsii*, es una especie perenne; con ramificación y florecimiento axilar, se extiende formando grupos amplios y compactos de rosetas blandas y suculentas, la inflorescencia que presenta tiene forma de espiga que mide 1.57 a 1.60 m de altura, con frutos dehiscentes que albergan cientos de semillas negras, de forma semiesférica y aladas (Gentry, 1982). Habitando en peñascos compuestos por rocas calcáreas con difícil retención de humedad; se propone evaluar el efecto del potencial hídrico (Ψ_A) en la germinación de semillas y el desarrollo de plántulas de *Agave celsii* var. *celsii*, en medio de cultivo MS al 100 % de sus componentes adicionado con manitol; el cual ha sido utilizado como agente osmótico para simular condiciones de déficit hídrico debido a que es un compuesto químicamente inerte y no tóxico; planteando si existe una relación entre el incremento de las concentraciones de manitol en el medio de cultivo para disminuir la disponibilidad de agua e inhibir o retrasar la germinación, analizando también la supervivencia de las plántulas durante su establecimiento *ex vitro*.

2.- ANTECEDENTES

GENERALIDADES DE LOS AGAVES

Los agaves son plantas xerófilas suculentas con una ruta fotosintética de tipo CAM y una baja tasa de crecimiento; las hojas o pencas que tienen son de forma lanceolada con una espina terminal y cubierta cerosa; generalmente son gruesas de parénquima esponjoso de color que va desde verde lustroso brillante a azul grisáceo opaco (Nobel, 1988); las cuales una vez desenrolladas comienzan a desdoblarse hacia afuera con un arreglo en forma de espiral para formar la roseta característica de los agaves (Gentry, 1982).

Tienen raíces de fibra dura poco profundas, presentan tallos gruesos; con inflorescencias en forma de espiga o paniculadas con escapo largo semileñoso; las flores son de color amarillo verdoso, presentando seis estambres; con anteras amarillentas; ovario ínfero, trilocular, tricarpelar, el fruto es una cápsula con aspecto de baya, dehiscente con 3 alas, con numerosas semillas, las cuales son triangulares, con endospermo carnoso y testa negra (Gómez, 1963; Gentry, 1982; López, 1989; Irish e Irish, 2000).

El sistema vascular se elonga a través de las hojas creando fibras que corren a lo largo de toda la penca; en algunas especies como *A. sisalana* y *A. fourcroydes*, ésta característica se encuentra muy marcada, las hojas fibrosas hacen clara la distinción entre los agaves y los aloes parecidos superficialmente ya que el Aloe presenta estructura gelatinosa al interior, nunca con fibras (Irish e Irish, 2000).

Las características de las hojas son empleadas como un instrumento para diferenciar una especie de otra, especialmente cuando no hay disponibilidad de flores; sin embargo, en hojas de una especie cuya distribución es extensa, usualmente se encuentra una variación enorme (Irish e Irish, 2000).

La familia Agavaceae cuenta con ocho géneros y alrededor de 350 especies que se caracterizan por sus adaptaciones xerofíticas, siendo el género *Agave*, uno de los ocho de la familia; con su denominación procedente de una raíz griega que significa admirable, palabra que describe no solo su apariencia y la forma en que sobrevive en medios semidesérticos, sino también algunas características como la floración que ocurre solo una vez en la vida de la planta para después morir. Este género es el más grande de la familia; cuenta con alrededor de 200 especies, más 47 categorías infraespecíficas, dando un total de 247 taxa, de este total, 150 especies o el 75% se encuentra en México convirtiéndolo en el país con mayor diversidad de agaves (García-Mendoza, 2002), género que a su vez está compuesto por dos subgéneros: *Litsea* y *Agave* que son diferenciados principalmente por la inflorescencia que presentan, de acuerdo con Gentry (1982).

El subgénero *Litsea* comprende ocho grupos, los cuales se caracterizan por presentar una inflorescencia de apariencia espigada y flores en pares; la mayoría de sus especies y variedades presentan fibras de buena calidad, así como un alto contenido de saponina de acción detergente en sus pencas, tal es el caso de *Agave lechuguilla*; aunque hay otras especies de uso exclusivamente ornamental, como *A. victoriae-reginae* (Gob. Edo. Hgo, 1988; Tambutti, 2002).

Por otra parte, para el subgénero *Agave* se han descrito 12 grupos, los cuales presentan las inflorescencias de forma paniculada; las flores se encuentran en grandes agregados umbelados conformando varias inflorescencias racimosas (López, 1989). De las especies que lo componen y explotan se producen bebidas fermentadas, como el pulque; destiladas, como el tequila y los mezcales; además de la obtención de forrajes y alimentos se obtienen fibras, principalmente de *Agave fourcroydes* (henequén) y *Agave lechuguilla*.

DISTRIBUCIÓN

El subgénero *Littaea* tiene distribución restringida, no se encuentra en Baja California ni en Yucatán y se localiza desde Utah, Nevada y Arizona en los Estados Unidos de Norteamérica hasta Guatemala, mientras que el subgénero *Agave* se encuentra de California a Texas, sur de Florida hasta Perú, Colombia y Venezuela, incluyendo las Antillas y Centroamérica (Gómez, 1963; Eguiarte *et al.*, 2000).

Las especies de *Agave* en México pueden localizarse entre 1000 y 2000 msnm (García-Mendoza, 2002); en ambientes diversos como: bosques de pino-encino, selva baja caducifolia, matorral xerófilo y bosque mesófilo de montaña (García-Mendoza, 1995); esta riqueza se debe principalmente a los hábitats tan heterogéneos que presenta el país los cuales difieren en clima, geología, topografía y suelos que generalmente van desde los formados por rocas ígneas, hasta los calcáreos de origen marino, así como a las propiedades intrínsecas de cada taxón tales como la plasticidad genética, la tolerancia ecológica, la capacidad de dispersión, la germinación de sus semillas y las interacciones con otros organismos incluidos los polinizadores (García-Mendoza, 2002).

REPRODUCCIÓN DE LOS AGAVES

REPRODUCCIÓN SEXUAL

La reproducción sexual de muchas especies de la familia Agavaceae involucra la producción de un escapo o quiole, flores, frutos y semillas, como una forma convencional de originar progenie (Gentry, 1982; Nobel, 1998); proceso denominado monocarpia, que caracteriza a tres cuartas partes de las especies de este género (Nobel, 1998), que solo tienen una floración durante toda su vida, después de transcurridos entre 8 y 10 años; llegan a la madurez, generan sus estructuras sexuales y presentan su floración, para que al término de está la planta muera; ya que gasta una gran cantidad de energía en lo que se llamaría propagación de floración, pues la reproducción de la primera estación caracterizada por la formación del escapo o quiole, cuyo tamaño oscila desde unos cuantos decímetros a varios metros de altura según la especie; representa un gasto de alrededor de la mitad de la energía medible en la biomasa de la planta; además en contraste con otros géneros de la misma familia reciben beneficio de una amplia variedad de polinizadores que se alimentan del polen y néctar (Schaffer y Schaffer, 1977); presentando el síndrome de Quiropterofilia, puesto que morfológica, bioquímica y temporalmente los caracteres de estas plantas son consistentes con este, a tal grado que se han establecido relaciones de mutualismo entre ciertos agaves y los murciélagos liberadores de polen, fenómeno que se ha visto afectado debido a la explotación de los agaves por el hombre contribuyendo con la reducción de los murciélagos polinizadores, afectando la ecología de las poblaciones y comunidades desérticas (Granados, 1999). Este tipo de reproducción involucra variabilidad, la información será

recombinada, generando una amplia gama de posibilidades debido a la plasticidad fenotípica, resultando nuevas oportunidades de sobrevivencia y establecimiento de forma individual, sin embargo genera altos costos energéticos y origina poco éxito poblacional (Rosas, 2002); ya que, aun cuando exista una alta cantidad de semillas en la reproducción sexual, es muy poca la descendencia, dado que una gran parte resultará estéril, otra porción será depredada y solo algunas semillas podrán germinar, sin embargo estas dependerán de las condiciones ambientales y climáticas ya que no siempre serán adecuadas (Granados, 1999).

PROPAGACIÓN VEGETATIVA

Se ha sugerido que varias especies de agaves no presentan reproducción sexual, solo propagación vegetativa (Gentry, 1982), mediante el brote de plántulas en la base del tallo y mediante un proceso denominado apomixis (Nobel, 1988; Arizaga y Ezcurra, 1995), el cual puede generarse por la formación de propágulos en las partes axilares de la inflorescencia, evento que se presenta con poca frecuencia, ya que es ocasionado principalmente cuando la producción de frutos no es abundante (Granados, 1999). En las zonas áridas, el establecimiento de nuevos individuos por la vía sexual es poco frecuente debido a las condiciones extremas de temperatura y disponibilidad de agua, en cambio la propagación vegetativa es común y ecológicamente importante como estrategia de sobrevivencia y establecimiento rápido (Palleiro, 2001).

Las estructuras vegetativas generadas, como tallos, bulbos, rizomas y esquejes tienen mayores posibilidades de establecimiento que las plántulas procedentes de semilla, además estas estructuras poseen una gran cantidad de recursos al presentarse en mayor cantidad, ya que el tiempo de crecimiento y establecimiento es menor, son plantas menos susceptibles a la depredación (Arizaga y Ezcurra, 2002). Esta forma de propagación vegetativa puede presentar una vía para rescatar o eliminar el gasto energético que se efectúa en la producción de un ovario de grandes dimensiones, donde una vez formado el escapo floral la planta desarrolla bulbillos, cuando la producción de frutos fracasa (Arizaga y Ezcurra, 1995).

Debido a que la mayoría de las especies de agave económicamente importantes no se propagan por semilla, se cultivan en grandes cantidades, mediante bulbillos; los cuales se pueden establecer en la periferia; la planta progenitora, generalmente son de al menos 10 cm de largo al tiempo de la cosecha y pueden sembrarse directamente en la tierra, conformando una red de material muerto en el centro; este sistema de multiplicación también ocurre con otras especies de agaves, como *Agave angustifolia* del centro de México (Granados, 1999).

IMPORTANCIA DE LOS AGAVES EN MÉXICO

El territorio mexicano posee una extraordinaria riqueza botánica, dentro de la cual se encuentran las plantas suculentas caracterizadas por tener todos o algunos de sus órganos gruesos y carnosos, por lo que también reciben el nombre de plantas crasas; la suculencia es un fenómeno de adaptación de las plantas al ambiente, este fenómeno consiste en el engrosamiento de los tejidos parenquimatosos, que

permiten el almacenamiento de grandes cantidades de agua; podemos dividir a las plantas suculentas en dos grandes grupos: las suculentas de tallo como las cactáceas y las suculentas de hoja, como las agaváceas (Lot y Chiang, 1986).

Los agaves fueron descritos por primera vez por el botánico sueco y padre de la taxonomía moderna, Carlos Linneo, en 1753, nombrando a la primera especie de agave, *A. americana* (Nobel, 1988). El nombre común de maguey que actualmente utilizamos los mexicanos al igual que nopal, maíz, pitaya etc., no es un vocablo autóctono de México, sino de origen taino, un pueblo amerindio que habitó los países de Cuba, Puerto Rico y Jamaica; el cual fue traído y empleado por los españoles en la época colonial, debido a la majestuosidad que observaron en estas plantas y a los múltiples beneficios que de ellos obtenían nuestros antepasados; (Cházaro y Hernández, 2006); por lo cual la inmensa diversidad de usos y costumbres es asociada a múltiples culturas en prácticamente todo el país (Tambutti, 2002).

Los pueblos indígenas usaban las plantas de su entorno para cubrir sus necesidades básicas (Nobel, 1998), las plantas de agave fueron reconocidas como un don divino enviado por los dioses, tomándolas como objeto de veneración y explotación, puesto que muchos de sus productos tenían además de un fin utilitario, propósitos rituales específicos; proporcionando no sólo un recurso natural de difícil prescindencia, sino un bien que formaba parte de una concepción global de la vida y la naturaleza; de ahí el cuidado que se le tenía en especial cuando se seleccionaban los renuevos o hijuelos con los que se continuaría la siembra (Gob. Edo. Hgo, 1988).

Hoy en día, el uso del maguey, sigue vigente, en la extracción de fibras para el mercado textil y cordelería, en la elaboración de diferentes bebidas alcohólicas como pulque, mezcal, tequila, bacanora; como alimento utilizando los botones de las inflorescencias; aprovechados también por las propiedades medicinales que algunas especies presentan así como en la formación de cercas naturales (Ramírez, 1995; González, 2005).

Tienen gran importancia ecológica, debido a su capacidad para retener el suelo y evitar la erosión hídrica, además de su papel en la cadena alimenticia de especies nectaríferas y poliníferas, ya que pueden presentar dominancia en matorrales xerófilos, especialmente aquellos denominados crasicales y rosetófilos; Siendo un recurso importante en las zonas áridas debido a su naturaleza perenne, mientras que muchas especies de matorral xerófito no se encuentran durante la época de secas, cuando hay pocos recursos de agua o néctar disponibles (Nobel, 1998; Arizaga y Ezcurra, 2002)

AGAVE CELSII* HOOK VAR. *CELSII

Es una especie perenne; con ramificación y florecimiento axilar, se extiende formando grupos amplios y compactos de rosetas blandas y suculentas de 60 a 65 cm de altura por 100 a 120 cm de diámetro; de las cuales brotan las hojas que miden de 50 a 53 cm de longitud por 11 a 12 cm de ancho, son de forma ovalada, oblonga o espatulada, cortas ascendiendo hacia fuera, acanaladas, de color verde brillante, margen recto; dientes de 1.5 a 2 mm de longitud, poco separadas de color rojizo; espina débil, acicular, de 1.3 a 1.5 cm de longitud, poco decurrente, de color café.

La inflorescencia que presentan tiene forma de espiga que mide 1.57 a 1.60 m de altura, posee brácteas numerosas, coriáceas y deltoides de 2 a 7 cm de longitud; cápsulas ásperas de color café oscuro, de 19 a 22 mm de largo por 10 a 20 mm de diámetro; las semillas son de 4 por 3 mm, negras, de forma semiesférica y aladas (Fig. 1) (Gentry, 1972).



Figura1.- *Agave celsii* Hook var. *celsii*. (Tomado de Gentry, 1982).

Se reproduce mediante semillas y vegetativamente por bifurcación axilar con un número de vástagos de 4 a 6 formando como consecuencia de ello grupos extensos de rosetas; con el escapo y cápsulas florales verdes y carnosas en vías de maduración a principios del mes de octubre, siendo a finales de diciembre y principios de enero cuando las cápsulas están maduras; presentando la floración posiblemente en los meses de mayo a julio (Calderón, 1987).

DISTRIBUCIÓN Y USOS DE *Agave celsii* var. *celsii*

Agave celsii var. *celsii*, se encuentra moderadamente distribuido en los estados de Nuevo León, San Luís Potosí, Tamaulipas e Hidalgo; en este último se localiza en los municipios de Actopan y Zimapán (Villavicencio *et al.*, 1998); también se han encontrado varias poblaciones pequeñas en los acantilados en el noreste y suroeste de Jacala a lo largo de la ruta 85 hacia Zimapán. Este agave crece sobre peñascos de rocas volcánicas, lutitas y limonitas calcáreas, con suelos de tipo Litosol y Vertisol crómico; en pendientes muy pronunciadas y en altitud que va desde 1400 a 2500 msnm (Gentry, 1982).

Calderón (1987), realizó un trabajo enfocado a la etnobotánica de los agaves del Valle del Mezquital; donde reporta las formas en las que es utilizado el agave por los Otomíes; así como el aprovechamiento de cada una de las partes de la planta; resaltando el hecho de que a través de diferentes estaciones del año siempre se tienen algunos elementos de recolección ya sean escapos florales o quiotes, capullos florales, hojas, aguamiel, gusanos y hongos, mismos que son utilizados principalmente para consumo humano y como forraje, además de algunos usos domésticos y medicinales. *Agave celsii* var. *celsii*, es reconocido por los

pobladores como “maguey de comezón”; ya que por lo irritante del jugo de sus hojas, es un maguey que causa mucho más comezón que otros, es identificado como maguey que cuelga o se arrincona en lo alto llamado “maguey de la peñas”; y también le conoce como “siempreviva” ya que todo el tiempo mantiene su color verde. El empleo de este agave está prácticamente restringido a los usos ceremonial, medicinal y de ornato, ocupando la planta entera de entre 15 a 25 cm de altura para adornar el nacimiento durante las fiestas navideñas, por lo que en el mes de diciembre es usual que en el mercado de Ixmiquilpan lo vendan (Calderón, 1987).

Las plantas de *Agave celsii* var. *celsii* son utilizadas para curar la tifoidea y dolor de cabeza, preparando una solución para realizar baños al enfermo; el cual debido a la enfermedad no sentirá la comezón característica originada con el jugo de este maguey; de la misma forma se emplea para tratar la gripe que es tratada mediante una preparación de 3 litros de agua de nixtamal, con el jugo de un limón y sal, calentando sin llegar a la ebullición; posteriormente se frota al enfermo cubriendo la cabeza con un ayate durante 15 minutos, durante la noche.

También se cuenta que anteriormente en la prisión de Zimapán utilizaban una gran cantidad de las hojas de esta planta para castigar a los presos echándolos desnudos en la pileta con agua helada durante la madrugada; con la finalidad de que estas personas se “enguixaran” (les diera una comezón insoportable) mostrándose como ejemplo para mejorar el comportamiento de los demás presos (Calderon, 1987).

LAS SEMILLAS DE AGAVE.

El fruto es una cápsula leñosa con diversas formas y tamaños, creciendo en las zonas axilares del escapo floral; presentan tres secciones en el interior (triplacentarios); son dehiscentes con seis columnas delgadas, y un gran número de semillas, que son estructuras muy resistentes a factores ambientales extremos (deshidratación y altas o bajas temperaturas); generalmente las semillas de agave son negras cuando son fértiles y grises o blanquecinas cuando son estériles (Gómez, 1963; Gentry, 1982).

Freeman (1973, 1975) realizó trabajos sobre la respuesta germinativa en dos especies de la familia Agavaceae, *Agave lechuguilla* y *Agave parryi* evaluando en ambas especies el pH, temperaturas constantes y estrés hídrico; obteniendo que el pH óptimo para esta especie entre 7.3 - 7.8; los porcentajes de germinación fueron variando entre el 75 y 95 % para cada especie, entre los rangos de 25 y 35° C descritos como óptimos para generar el ambiente apropiado en el que pudieron establecerse las semillas para germinar y señalando que a los 40 °C este proceso se ve afectado, explican que la disminución en la germinación de las semillas en ambas especies, se presentó después del periodo de lluvia, donde aumenta temporalmente la disponibilidad de agua en el suelo y posteriormente la temperatura ambiental.

Jordan y Nobel (1979), realizaron estudios sobre factores que intervienen en la germinación de semillas de *Agave deserti* así como en el crecimiento de las plántulas; consideraron que el estudio se efectuó debido a que el desarrollo de las plántulas de la especie originadas mediante semilla es un evento poco común en

el desierto de Sonora, ya que aparentemente sólo una semilla de entre más o menos un millón llega a ser una planta madura; por otra parte explican que es muy difícil encontrar plantas jóvenes, señalando que los micro-hábitats resguardados pueden ser cruciales para el establecimiento de las plántulas originadas por semillas ya que entre otras cosas algunas plantas nodrizas como *Hilaria rígida*, ya que les proporcionan humedad y protección durante la fase de desarrollo y establecimiento. Así mismo, mencionan que el crecimiento inicial de las plántulas fue favorecido por las lluvias de finales de verano y principios de otoño; finalmente y con base en el trabajo realizado hacen la observación de que solo los últimos 17 años han sido favorables para el establecimiento de hijuelos originados por semilla.

Por otra parte Pritchard y Miller (1995) evaluaron el efecto de temperaturas constantes, así como la calidad de luz y semillas en la germinación de *Agave americana*; con el objetivo de entender el control ambiental en esta especie, evaluando periodos 12 hrs de luz entre 11 °C y 16 °C, y entre 36 y 40 °C, respectivamente, por otra parte la calidad de las semillas redujo mediante siete condiciones ambientales; obteniendo el máximo para ambos parámetros de crecimiento y producción de plántulas en las temperaturas de 21 °C y 31 °C y el tiempo mínimo para la germinación que en ambos casos fue a 26 °C, indicando que la temperatura, la luz y la calidad de las semillas afectan la respuesta germinativa de las semillas de *Agave americana*.

Martinez y Chávez (1996) evaluaron el potencial reproductivo de *Agave victoriae-reginae*, en siete poblaciones en dos tipos de sustrato; suelo horizontal erosionado y pared de roca de carbonato de calcio; donde pudieron observar sitios con menos de 5 individuos en estado potencial de reproducción y diferencias en el tamaño de organismos en ambos ambientes. De esta manera cuantificaron el número de frutos por fructificación y el número de semillas por fruto, registrando fructificaciones con 2560 frutos, y un promedio de 102 semillas por fruto, generando un total de 260,000 semillas por planta; las cuales fueron almacenadas en frascos color ámbar a temperatura de 8 a 12 °C germinándolas en condiciones de invernadero y en condiciones *in vitro*, reportando altos porcentajes de germinación (90-100%) en semillas generadas el mismo año de colecta a diferencia de las que fueron rescatadas de frutos dehiscentes con más de un año de edad, presentando porcentajes de germinación entre 20 y 80 %.

Malda y Maqueda, (2004) realizaron una comparación del crecimiento de magueyes pulqueros *Agave salmiana* y *Agave mapisaga*; iniciando con la siembra de semillas en cultivo *in vitro* en medio Murashige y Skoog (1962) las cuales se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 28°C y luz fluorescente/incandescente con 16hr luz/8hr oscuridad; simultáneamente sembraron semillas en condiciones de invernadero, utilizando una mezcla comercial de vivero (turba, vermiculita y arcilla dolomítica), a las plántulas obtenidas se les aplicaron dos mezclas nutritivas, la primera presentando un esquema de fertilización aplicable para invernaderos, y la segunda mezcla similar a los niveles contenidos en la solución nutritiva del cultivo *in vitro*, monitoreando periódicamente la humedad mediante un sistema de riego constante.

En ambos casos se registraron las respuestas de germinación y crecimiento de las plántulas obtenidas determinando el número de hojas nuevas, tamaño de las rosetas y la actividad fotosintética CAM mediante titulación de ácidos en los tejidos, observando que la germinación para las dos especies no fue muy diferente, alcanzando el 87% de germinación para *A. salmiana* y 83% para *A. mapisaga* y en ambos casos el porcentaje final de germinación en condiciones controladas resultó menor que bajo condiciones de invernadero, sin embargo las condiciones *in vitro* favorecen la velocidad de germinación; proponiendo la posibilidad de propagación masiva de las especies seleccionadas mediante el empleo de estas técnicas y por otra parte, que este tipo de cultivo puede tomarse como punto de partida para explorar posibilidades de lograr tasas más rápidas de crecimiento en agaves.

CULTIVO DE TEJIDOS

El cultivo de tejidos es un conjunto de técnicas que permiten cultivar de forma aséptica órganos, tejidos, células y protoplastos, mediante el uso de medios de cultivo nutritivos; los cuales pueden ser sólidos, líquidos o semisólidos; siendo el más usado el medio Murashige y Skoog (1962); el cual contiene compuestos orgánicos, como son los macronutrientes, micronutrientes y cloruro de calcio; también se encuentran los compuestos inorgánicos, que son vitaminas, inositol, solución de FeEDTA y glicina (Jain y Babbar, 2002); aunque los medios son específicos de acuerdo a los requerimientos de cada especie, en cuanto a fuentes de materia química y reguladores de crecimiento (Malda *et al.*, 1999; Fontúrbel, 2002).

Para la propagación *in vitro* de agaves, se han aplicado diferentes técnicas de cultivo, utilizando segmentos foliares, bulbillos, semillas, callos, meristemos y yemas (Tabla 1). La mayoría de estas técnicas se ha enfocado a la multiplicación masiva a través de brotes adventicios y/o auxiliares y la producción de embriones somáticos (Martinez y Pacheco, 2006).

Tabla 1.- Algunos estudios *in vitro* realizados en diferentes miembros de la familia Agavaceae

Especie	Tipo de explante	Medio de cultivo	Reguladores de Crecimiento (mg/l)	Resultados	Referencia
<i>A. arizonica</i>	Segmentos de tallo de bulbillos	MS	(0.30) AIB (0.30) AIA (1) KIN	Callo, y brotes adventicios	Powers y Backhaus, 1989.
<i>A. sisalana</i>	Segmentos de tallo de hojas <i>in vitro</i>	MS + 20 g/l sacarosa, 10% agua de coco	(0.75) ANA (1) AIB (0.5) KIN	Múltiples brotes, callo, y plántulas enraizadas	Binh <i>et al.</i> , 1990.
<i>A. victoriae-reginae</i> .	Segmentos de hojas <i>In vitro</i>	MS + vitaminas 30 g/l sacarosa	(3) 2,4-D	Embriogénesis somática directa	Rodríguez <i>et al.</i> , 1996.
<i>A. sisalana</i>	Segmentos de tallo, bulbillos y rizoma.	MS, SH; Gamborg y white	(0.5 – 1) AIA (0.5) ANA (1) KIN	Callo, múltiples brotes y regeneración de plántulas	Nikam, 1997.
<i>A. parrasana</i>	Semilla	MS + vitaminas 30 g/l sacarosa	(0 -1) 2,4-D (1- 8) BA	Proliferación de brotes axilares	Santacruz <i>et al.</i> , 1999.

BA, 6-bencilaminopurina; KIN, 6-furfuril-aminopurina; 2-iP, 2-isopentenil adenina; ANA, ácido naftalenacético; AIA, ácido 3-indol-acético; AIB, ácido 3-indol-butírico; MS, medio de Murashige y Skoog (1962); SH, Schenk y Hildebrant.

Continúa...

Continuación.

Tabla 1.- Algunos estudios *in vitro* realizados en diferentes miembros de la familia Agavaceae.

Especie	Tipo de explante	Medio de cultivo	Reguladores de Crecimiento (mg/l)	Resultados	Referencia
<i>A. fourcroydes</i>	Meristemos apicales de plantas seleccionadas	MS	(2) 2,4-D (1) BA	Embriogénesis somática	Gonzalez <i>et al.</i> , 2001
<i>A. sisalana</i>	Segmentos de hojas <i>In vitro</i>	MS 100 % 50 %	(1) BA (2) BA	Callos y proliferación de brotes adventicios	Harza <i>et al.</i> , 2002.
<i>A. sisalana</i>	Brotes <i>in vitro</i>	MS	(1 – 2) KIN (0, 0.09) 2,4-D (0.5) BA	Embriogénesis somática	Nikam, 2003.
<i>A. victoriae-reginae</i> .	Segmentos de tallo de plántula	MS	(5) 2,4-D	Callos Embriogénicos, y embriogénesis somática	Martinez <i>et al.</i> , 2003.
<i>A. coui</i>	Segmentos de Hojas <i>In vitro</i>	MS	(1) 2,4-D (1) BA	Callos y organogénesis indirecta	Yépez y Vargas, 2004
<i>A. fourcroydes</i>	Yemas apicales de bulbillos	Knudson	(0.2) BA (0.3) KIN	Proliferación de Brotes y Callos organogénicos	Muñoz <i>et al.</i> , 2004.
		MS	(1) KIN (0.5) ANA		

BA, 6-bencilaminopurina; KIN, 6-furfuril-aminopurina; 2-iP, 2-isopentenil adenina; ANA, ácido naftalenacético; AIA, ácido 3-indol-acético; AIB, ácido 3-indol-butírico; MS, medio de Murashige y Skoog (1962); SH, Schenk y Hildebrandt.

POTENCIAL HÍDRICO (Ψ_A)

El agua es el solvente común por excelencia, presentando propiedades únicas, que determinan muchas de las actividades vegetales y las sustancias que en ella están disueltas (Salisbury y Ross, 1994, Rodríguez, 2006.); siendo el componente predominante de los organismos, interviene en la regulación de los procesos biológicos (Steudle, 2000; Andreev, 2001), ya que comprende de 80 a 90% de la biomasa en tejidos vegetales, presente en varias formas: como constituyente del protoplasma; como agua de hidratación asociada con iones, disolviendo sustancias orgánicas y macromoléculas, llenando espacios entre estructuras finas del protoplasma y la pared celular, almacenada en las vacuolas y finalmente, como agua intersticial, que actúa como medio transportador en los espacios intercelulares y en los tejidos de conducción del xilema y el floema (Larcher, 2003; Zyalalov, 2004). En condiciones de alta concentración de solutos, las células ejercen presión de turgencia contra las paredes celulares, lo que soporta el crecimiento celular, la disposición de agua durante el crecimiento de una planta afecta el desarrollo de sus semillas, teniendo efecto en la capacidad germinativa en forma positiva o negativa (Pallas *et al.*, 1977, Adegbuyi *et al.*, 1981, Fanti *et al.*, 2004).

El estrés hídrico se produce cuando la absorción de agua por un cultivo es más baja que la demanda evaporativa de la atmósfera (Acevedo *et al.*, 1999), se produce un estado de estrés que incluye tanto la sequía como la salinidad; afectando la expresión génica (Zhu, 2002, 2003); generando cambios en el metabolismo celular, hasta alteraciones en las tasas de crecimiento y productividad (Cárdenas y Monter, 2002; Costa *et al.*, 2004).

El estado del agua en los suelos, las plantas y la atmósfera es descrito en términos de potencial hídrico (Ψ_A) que consta de varios componentes importantes para las células y sus alrededores: el potencial osmótico (Ψ_π) está determinado por la concentración de sustancias osmóticamente activas; el potencial mátrico (Ψ_m) registra la capacidad de adsorción de las matrices celulares; el potencial de presión (Ψ_p) registra las presiones en exceso que actúan sobre un sistema y el potencial gravitacional (Ψ_g) es consecuencia de las diferencias de altura con el nivel de referencia (Larcher, 2003).

En dos compartimientos de diferente potencial hídrico separados por una membrana semipermeable, el agua se mueve desde el compartimiento de un alto potencial hídrico hacia el de bajo potencial hídrico. Las diferencias en este potencial ofrecen la posibilidad de ocurrencia para un proceso que permita mantener la homeostasis celular, ya sea por transporte de agua y otras sustancias entre células, tejidos y órganos (iones, carbohidratos, aminoácidos, etc.) a favor de gradientes de potencial hídrico (Andreev, 2001; Canny, 2001; Salisbury y Ross, 1994; Steudle, 2000; Zyalalov, 2004).

El potencial del agua pura es por definición cero (Salisbury y Ross, 1994), la presencia de cualquier sustancia disuelta en el agua disminuye su potencial de manera que el potencial de agua de una solución es inferior a cero, esta definición solo es válida a presión atmosférica, la elevación o disminución de la presión alrededor de un sistema automáticamente asciende o desciende el potencial de agua en exactamente la misma cantidad (Bidwell, 2000) generando la necesidad

de conocer el comportamiento de las semillas en condiciones de estrés hídrico se han desarrollado diferentes estudios como el realizado por Dos-Santos *et al.* (1992), que evaluaron el efecto del estrés hídrico y salino en la germinación de semillas de soya, empleando potenciales osmóticos de 0,-0.3,-0.6, -0.9, -1.2 y -1.5 Mpa, generados mediante la adición de manitol, reportando que el porcentaje de germinación disminuye conforme la concentración de manitol aumenta, obteniendo plántulas con radícula e hipocotilo poco desarrollados.

Por otra parte Braccini *et al.* (1996), verificaron el uso de soluciones de cloruro de sodio (NaCl), manitol y polietilenglicol (PEG 6000), para simular condiciones de baja humedad; obteniendo potenciales hídricos de 0; -0,1; -0,3; -0,6 y -0,9 MPa; evaluaron la germinación de las semillas de soya y el crecimiento de la parte aérea de la planta así como el crecimiento radicular; obteniendo en sus resultados que el potencial hídrico más negativo genera una fuerte reducción en la germinación, y en el crecimiento en general de las plantas.

Maldonado *et al.* (2002), utilizaron 6 niveles de potencial hídrico logrados por la adición de manitol: 0, -0.2, -0.5,-0.9, -1.5 y -1.8 MPa, obteniendo una reducción significativa del número total de semillas germinadas de *Lycopersicon chilense*, a partir de potenciales menores a -0.5 MPa, al mismo tiempo que se observó un retardo en el inicio de la germinación, de las semillas expuestas a déficit hídrico a partir de los -0.9 MPa., reportando que con menor disponibilidad de agua la germinaron en promedio inicio entre el segundo y el sexto día, mientras que las plantas con mayor disposición de agua tuvieron un retardo significativo de la germinación de un día iniciando de 3 a 8 días.

Sánchez-Urdaneta *et al.* (2004) evaluaron el efecto del potencial de agua del sustrato en el crecimiento radical de plántulas de *Agave salmiana*; en condiciones de laboratorio; cuantificando el crecimiento radicular, en plántulas de 3 a 4 cm de longitud, manteniéndolas en vermiculita con potenciales hídricos de -0.03,-0.65,-1.48 y -2.35 Mpa, para posteriormente calcular el índice de daño y evaluar el efecto de la rehidratación en el crecimiento, observaron que los potenciales hídricos bajos del sustrato no afectaron significativamente la longitud de las plántulas, pero afectaron el peso fresco entre el 23 y 42 % aumentando el índice de daño, sin embargo con la rehidratación la raíz continuó su crecimiento.

Ávila *et al.* (2007), evaluaron la germinación de las semillas y el crecimiento de plántulas de canola, en condiciones de estrés hídrico inducido por soluciones de manitol, calculando la velocidad de germinación, el comportamiento de la raíz primaria y el hipotocótilo; así como el peso seco, y el crecimiento relativo de las plántulas; poniendo las semillas en soluciones de manitol + 0,2 % de fungicida Vitavax-Thiram, con potenciales hídricos de 0 (control), -0,25; -0,5; -1,0 y -1,5 MPa., observaron que el potenciales mayores a -1.0 Mpa promueven la reducción de la germinación; afectando la tasa de crecimiento de la canola.

3.- JUSTIFICACIÓN

La reducción de la humedad aprovechable en los suelos, ha sido considerada como un factor constante de estrés que limita la supervivencia de las poblaciones vegetales, motivo por el cual se propone el siguiente estudio con la finalidad de evaluar el comportamiento germinativo de las semillas y desarrollo de *Agave celsii* Hook. var. *celsii* (Agavaceae), generando déficit hídrico, en condiciones controladas (*in vitro*).

4.- OBJETIVOS

GENERAL

- ❖ Evaluar la germinación y desarrollo *in vitro* de semillas de *Agave celsii* Hook. var. *celsii* en medio de cultivo con diferentes potenciales hídricos.

PARTICULARES

- ❖ Determinar el potencial hídrico del medio Murashige y Skoog (1962) adicionado con 75, 85 y 105 g/l de manitol.
- ❖ Evaluar la germinación, el desarrollo y la morfología en plántulas de *Agave celsii*, germinadas en diferentes potenciales hídricos.
- ❖ Estimar el porcentaje de supervivencia *ex vitro* de las plántulas de agave.

5.- MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL BIOLÓGICO.

Se utilizaron semillas de *Agave celsii* Hook. var. *celsii*, colectadas en octubre de 2005, procedentes de La Encarnación municipio de Zimapán, dentro del Parque Nacional Los Mármoles, en el estado de Hidalgo. Se realizó una selección de semillas, tomando aquellas que presentaron uniformidad en el color (negro brillante), sin manchones pardos, grisáceos o blanquecinos, posteriormente se almacenaron en bolsas de papel encerado, manteniéndolas a temperatura ambiente, en un recipiente libre de humedad y de la incidencia de luz.

MEDICIÓN DEL POTENCIAL HÍDRICO (Ψ_A)

Se elaboró medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) (MS) al 100 % de sus componentes, adicionado con 75, 85 y 105 g/l de manitol; pH 5.7- 5.8; 30 g/l de sacarosa y 8 g/l de agar, el medio fue esterilizado en autoclave a 151 Kg/m³ durante 18 minutos. Una vez que el medio gelificó, se eligieron al azar 6 frascos de cada concentración de manitol, tomando muestras de 3 a 4 gramos, realizando 8 repeticiones por frasco, las cuales fueron colocadas en charolas plásticas de la cámara psicométrica (Dewpoint potentiometer; Wp4. Quick Start, Decagon, Devices. Inc. Versión 1.5); tomando la lectura del potencial hídrico (Ψ_A) expresado en megapascales (Mpa), posteriormente se realizó el mismo procedimiento para el sustrato, compuesto por una mezcla de tierra de hoja y piedra pómez (1:1) el cual fue humedecido a capacidad de campo.

CULTIVO *IN VITRO*.

Para el cultivo *in vitro* las semillas se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) durante 5 segundos, posteriormente fueron enjuagadas, y colocadas en paquetes de papel filtro, los cuales se mantuvieron en constante agitación pasando por el tren de desinfección que consistió en colocar en 50 ml de agua destilada con 3 gotas de jabón líquido Dawn, durante 20 minutos, posteriormente se transfirieron a 50 ml de alcohol al 70 % (v/v) durante 1 minuto, e inmediatamente se cambiaron a la solución de cloro comercial (NaOCl) al 20%

más 3 gotas de Tween 80, durante 30 minutos, finalmente en condiciones asépticas y con agua previamente esterilizada se realizaron 3 enjuagues durante un minuto aproximadamente.

Se sembraron 2 bloques de 150 semillas (5 semillas por frasco) para cada concentración de medio adicionado con las tres concentraciones diferentes de manitol, incluyendo un control *in vitro* (sin manitol); estas se mantuvieron en el cuarto de incubación con las siguientes características: temperatura constante de 26 +/- 2 °C, con un fotoperiodo de 8 horas de oscuridad por 16 horas de luz e intensidad luminosa de 28.24 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

CULTIVO EX VITRO.

Se realizó una siembra en sustrato compuesto de tierra de hoja y piedra pómez (1:1), esterilizada en el autoclave durante 25 minutos, sembrando 2 lotes con 60 semillas, los cuales fueron regados dos veces por semana a capacidad de campo, la siembra fue utilizada como referencia, para comparar la germinación *ex vitro* con las semillas sembradas en condiciones *in vitro* del medio de cultivo sin manitol.

La evaluación de la germinación en todos los casos se llevó a cabo diariamente durante 30 días; posteriormente para el análisis estadístico se consideraron los 2 bloques sembrados *in vitro*, conformando un total de 60 repeticiones (frascos con 5 semillas) por concentración, los datos obtenidos fueron contabilizados de forma acumulativa por día, obteniendo los porcentajes de germinación, los cuales fueron estandarizados mediante su transformación al arco seno $\sqrt{\% / 100}$ (Otegui *et al.*, 2007) y fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) y posteriormente la prueba de comparación de medias de Tukey (P=0.05).

TRANSFERENCIA *EX VITRO* Y SOBREVIVENCIA DE LAS PLÁNTULAS

Después de 12 semanas las plántulas se transfirieron de condiciones *in vitro* a condiciones *ex vitro*, una vez fuera del frasco las raíces se lavaron con agua corriente, para eliminar los residuos del medio de cultivo y con un vernier se realizaron mediciones de largo de raíz, largo total de la planta, también se les contaron las hojas que se formaron; para definir la tonalidad de las hojas se utilizó el atlas de colores de Küppers (1979).

Posteriormente las plántulas fueron colocadas en charolas de poliuretano, con tapa para evitar la desecación, utilizando un sustrato preparado con tierra de hoja y piedra pómez en proporción (1:1); las plantas se mantuvieron en el cuarto de incubación para permitir su aclimatización, evaluando de esta manera la sobrevivencia de las plántulas en condiciones *ex vitro*, durante las 2 primeras semanas del cambio, finalmente después de 10 semanas fueron trasladadas al invernadero.

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

POTENCIAL HÍDRICO (Ψ_A)

El incremento de manitol en el medio de cultivo, generó un potencial hídrico (Ψ_A) menor en las concentraciones de 75, 85 y 105 g/l de manitol, generando los potenciales hídricos (Ψ_A) de -1.58, -1.61 y -1.79 MPa en relación al medio sin manitol (control), que presentó un potencial hídrico de -0.87 MPa (Figura 2); los cuales al compararse presentan diferencias estadísticas ($F= 1435.1615$; $P < 0.0001$); al realizar el análisis de varianza de una vía (Anexo 1.-Tabla A). Sin embargo al realizar la comparación de medias de Tukey, no se presentan diferencias significativas entre las concentraciones de 75, 85 g/l de manitol ($F=2.842309$; $P=0.2645$) (Anexo 1.-Tabla B).

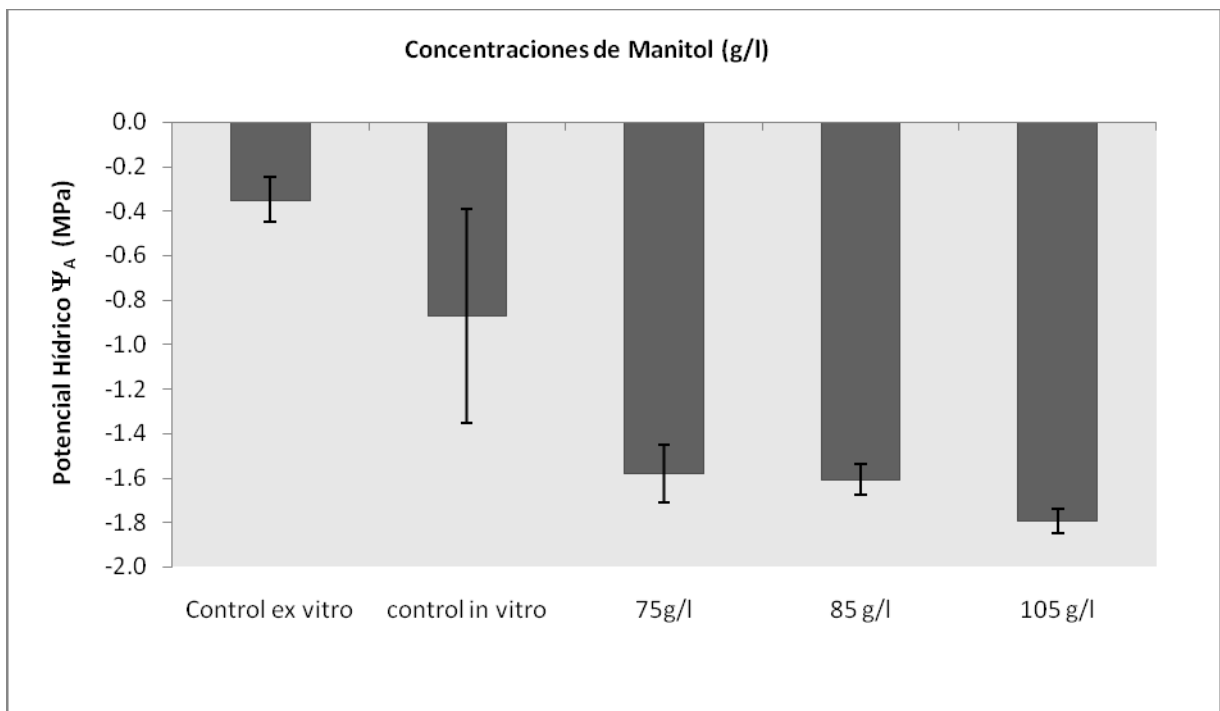


Figura 2.- Potencial hídrico (Ψ_A) del medio MS al 100% de sus componentes, adicionado con tres diferentes concentraciones de manitol y suelo.

Lo cual de acuerdo con lo reportado por Freeman, (1973,1975) en *Agave lechuguilla* y *A. parryi*; Braccini *et al.* (1996), en semillas de soya y Maldonado *et al.* (2002) con semillas de tomate, los resultados obtenidos coinciden con el hecho de que la disminución del potencial hídrico (Ψ_A) provoca una reducción en el número de semillas germinadas a partir de potenciales hídricos menores a -0.5 MPa; generando de igual manera una demora en el inicio del proceso germinativo.

Puesto que en las semillas de *Agave celsii* colocadas en medio de cultivo con un potencial hídrico de -0.87 Mpa, alcanzaron un 15% de germinación a partir del tercer día, en tanto que en el medio con -1.58 y -1.60 MPa el proceso germinativo inicio a partir del sexto día con el 6 y 1% de germinación respectivamente; observando que con poca disposición de agua y por consiguiente un menor potencial hídrico (Ψ_A) el porcentaje de germinación disminuye y retarda su inicio, ya que con el potencial de -1.79 Mpa el proceso comienza hasta el día 14 y solo genera el 8%; haciendo más obvio el retraso en el inicio de la germinación en el medio de cultivo adicionado con 105 g/l, en condiciones *in vitro*, puesto que en estas condiciones la disposición de agua es menor.

GERMINACIÓN

Considerando que la disponibilidad de agua es una de las causas más comunes de los bajos índices de germinación de acuerdo con Freitas y Lemos (2003) y tal como sucede con las semillas de *Agave celsii*, germinadas en condiciones *in vitro* y en condiciones *ex vitro* (Tabla 2); fue posible observar los tiempos y porcentajes de germinación, que estadísticamente presentaron diferencias significativas

($F = 133.99$; $P < 0.0001$) en el análisis de varianza de una vía (Anexo 2.- Tabla A) y en el análisis de comparación de medias de Tukey (Anexo 2.-Tabla B) donde es posible observar la diferencia entre el tratamiento control (sin manitol) y el medio adicionado con las concentraciones de manitol.

Tabla 2.- Potencial hídrico y porcentajes de germinación en semillas de *Agave celsii* var. *celsii*; en medio de cultivo con diferentes concentraciones de manitol y en suelo (control ex vitro).

Tratamiento	Ψ_A Medio de cultivo (Mpa)	Total Semillas sembradas	# semillas germinadas	% Semillas germinadas	Inicio de la germinación (días)
Control <i>ex vitro</i>	-0.34	60	49	81.7	8
Control <i>in vitro</i>	-0.87	300	224	74.7	3
75 g/l manitol	-1.58	300	42	14	5
85 g/l manitol	-1.61	300	33	11	6
105 g/l manitol	-1.79	300	25	8.3	14

Las semillas de *Agave celsii* var. *celsii* (Figura 3) sembradas *in vitro* como grupo control, iniciaron la germinación al tercer día la cual fue incrementándose del 3% al 50 % en un periodo de diez días, alcanzando el porcentaje de germinación máximo de 81.7 % .

Por otra parte y de manera similar, las semillas germinadas en el medio de cultivo adicionado con 75 y 85 g/l de manitol inician este proceso al sexto día, incrementando entre el séptimo y décimo sexto día al 9%, posteriormente se estabilizan, alcanzando el 13 % y 11% respectivamente; mientras que las semillas sembradas en MS con 105 g/l de manitol, iniciaron la emergencia de la radícula al noveno día, incrementando paulatinamente, alcanzando su estabilidad con el 8% de germinación al decimonoveno día

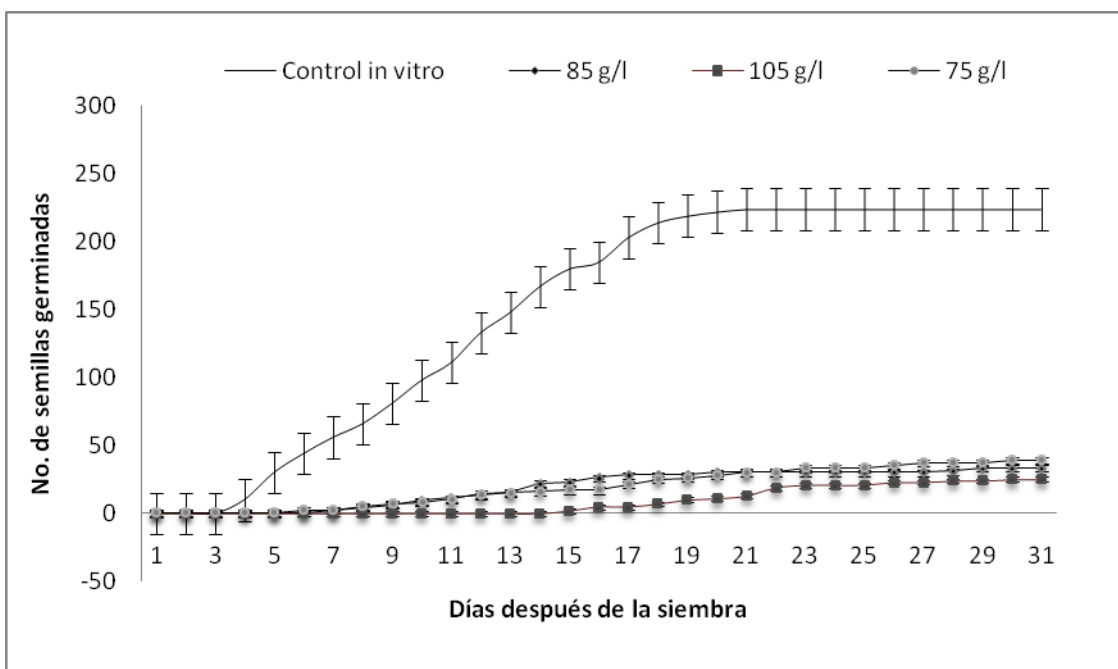


Figura.3.- Curvas promedio de germinación de *Agave celsii*. var. *celsii*; en medio (MS) 100 % adicionado con tres concentraciones de manitol y en suelo.

Considerando en este trabajo como criterio de germinación la emergencia de la radícula (Figura 4), el proceso se inicio con la imbibición de la semilla, hidratando sus tejidos y con ello dando paso a la activación enzimática, para posteriormente generar la activación y desarrollo del embrión, el cual para salir rompe la testa en la parte costal de la semilla, permitiendo así su crecimiento, sucesivamente la

radícula comienza a diferenciarse, conformando lo que posteriormente se reconocerá como cofia, después de la cual brotarán los primeros pelos radicales; finalmente, inicia la diferenciación de lo que será el hipocotílo, el cual comienza a crecer y diferenciarse a su vez generando el epicotilo, que se distingue con tonalidad verde y presenta una forma tubular, distinguiéndose de los primordios foliares.

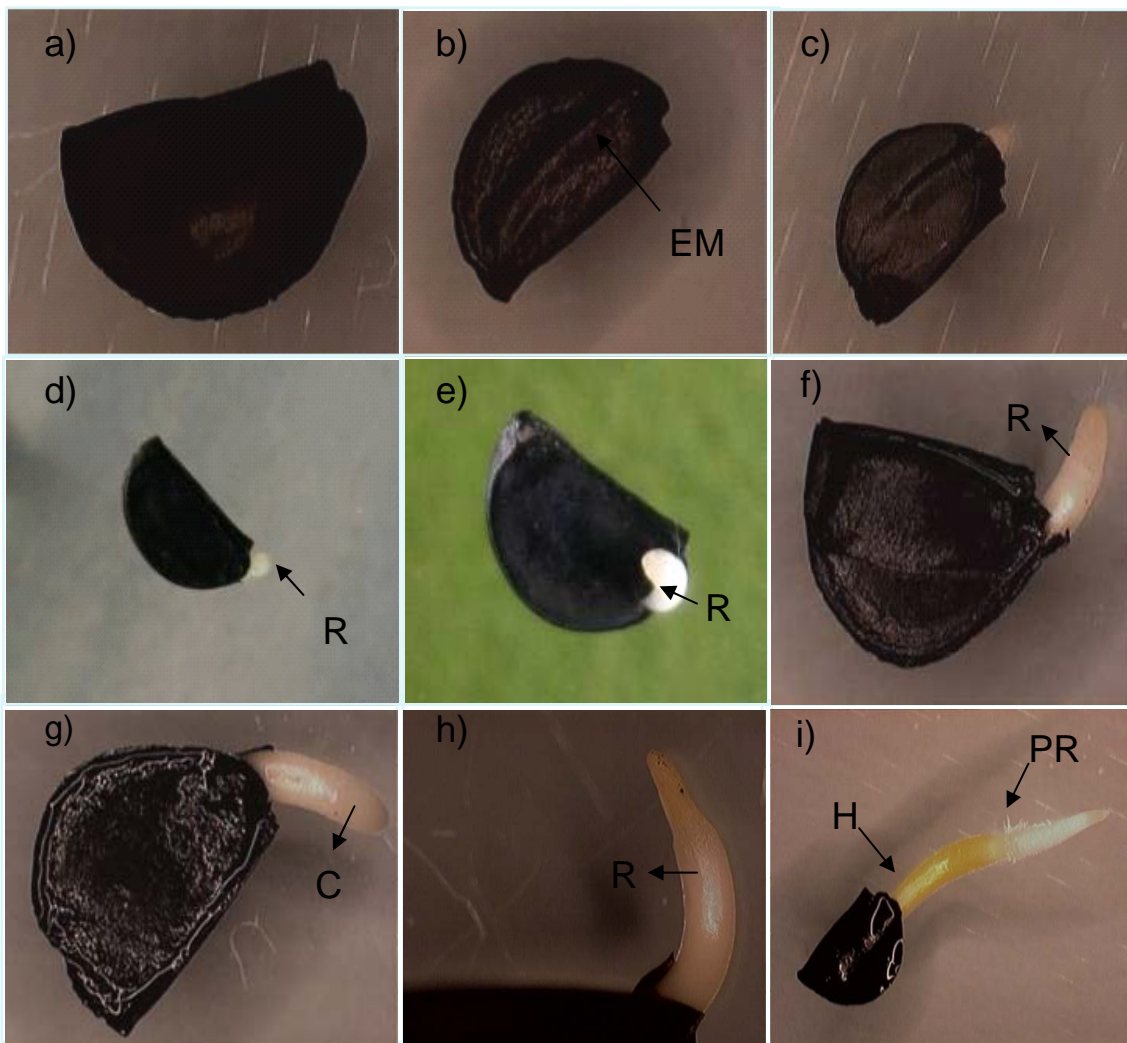


Figura.4.- Secuencia de la germinación en *Agave celsii* var. *celsii*, vista en microscopio de contraste de fases, con aumento de 40X. a) imbibición de la semilla; b) embrión (EM); c) ruptura de la testa; d) emergencia de la radícula (R); e) crecimiento de la radícula; f) diferenciación de la radícula; g) diferenciación de la cofia (C); h) diferenciación del hipocotílo (H); i) primeros pelos radicales (PR) y crecimiento del hipocotílo (H).

La disminución del potencial hídrico (Ψ_A) del medio de cultivo adicionado con las concentraciones de manitol generó una notable reducción en el porcentaje de germinación en comparación con las semillas germinadas en suelo, las cuales presentan diferencias estadísticamente significativas, entre los medios control, mientras que en las concentraciones de 75 y 85 g/l de manitol no se presentan diferencias significativas (Figura 5); generando una tendencia donde el porcentaje de germinación es menor conforme el potencial hídrico disminuye, pero sin llegar a inhibir completamente la germinación de las semillas.

En el control *ex vitro*, se observó que el inicio de la germinación, comienza a partir del octavo día de siembra, y aunque se presenta en un tiempo más largo, el porcentaje de germinación (81.7) es mayor que en el control *in vitro* (74.7) contrastando con los resultados de la germinación en medio de cultivo con potenciales hídricos más bajos.

La variación en el inicio de la germinación independientemente de la disposición de agua en el sustrato también puede estar ligada a la calidad de las semillas ya que de acuerdo con Pritchard y Miller (1996) es importante considerar este carácter debido a que si las semillas no se encuentran en condiciones óptimas el proceso germinativo, al igual que el desarrollo de las plántulas obtenidas es afectado, tal es el caso de *Agave americana*, que presentó una disminución en la germinación al reducir la calidad de las semillas con tratamientos de envejecimiento acelerado en siete condiciones ambientales, lo cual no se realizó en las semillas de *agave celsii*, sin embargo estas estuvieron expuestas a un

proceso de escarificación y desinfección que pudieron haber disminuido su capacidad para germinar y desarrollar plántulas.

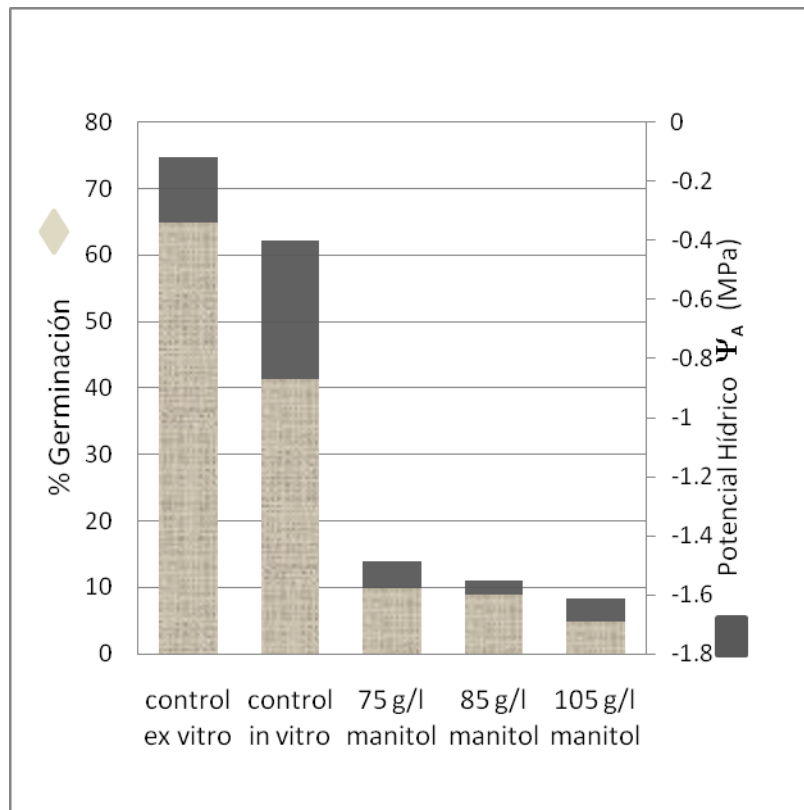


Figura. 5.- Relación entre el porcentaje de germinación (barra acumulada) y el potencial hídrico en medio de cultivo adicionado con manitol y el control *in vitro* y *ex vitro* (barra oscura).

En trabajos sobre el efecto el potencial hídrico en la germinación de especies como *Agave lechuguilla*; *A. parryi*; *A. deserti* y *Agave americana* (Freeman, 1973,1975; Jordan y Nobel, 1979) y especies como soya, canola y tomate se han reportado efectos similares, caracterizados por la disminución en la germinación debido a la adición de manitol en el sustrato y en algunos casos el tiempo de almacenamiento de las semillas, en *Agave celsii* var *celsii* independientemente del efecto del potencial hídrico, se podrían justificar los bajos niveles de germinación al tiempo de almacenamiento de las semillas de esta especie, por lo que, se coincide con el tiempo reportado por Freeman (1973, 1975) en las semillas de

Agave lechuguilla ,y *A. parryi* así como Martínez y Chávez, (1996) en las semillas de *Agave victoriae-reginae*, que han reportado un periodo de almacenamiento después de la colecta entre uno y dos años para iniciar la disminución de viabilidad de las semillas (Tabla 3) al comparar los resultados del porcentaje de germinación, obtenidos en este estudio con los de otros autores se observo que las semillas de *Agave* tienen un rango en cuanto a la temperatura durante la germinación.

Tabla. 3.-Tabla comparativa de los efectos de temperatura, potencial hídrico y tiempo de almacenamiento en la germinación bajo condiciones controladas.*Papel filtro (P.F)

Especie	Sustrato utilizado Tiempo de almacenamiento	% Germinación Temperatura Potencial hídrico	Inicio de la germinación (día)	Referencia
<i>A. lechuguilla</i>	*P. F /	80-95- 50 (25-35 °C) (0,-0.25,-.5, -1.0 Mpa)	4-8	Freeman, 1973
<i>A. parryi</i>	*P. F /	80 (25-35 °C) (0,-.25,-.5, -1.0 MPa)	2-8	Freeman, 1975.
<i>A. americana</i>	*P. F /	69-78-40	4-9-11	Pritchard y Miller, 1996.
<i>A. victoriae-reginae</i>	*P. F > 1 año	88 (20-25 °C)	-	Martinez y Chávez, 1996.
<i>A. mapisaga</i>	*P. F	87	5-6	Malda y Maqueda, 2004
<i>A. salmiana</i>	*P. F	83	5-6	
<i>A. celsii var. celsii</i>	MS 100% + manitol > 1 año	8-70 (26-28 °C) (-.35, -.87, -1.58, -1.60, -1.79 MPa)	3-8	Presente Trabajo

MORFOLOGÍA DE LAS PLÁNTULAS EN LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MANITOL EN EL MEDIO DE CULTIVO.

La morfología de las plántulas (Tabla 4), varió de acuerdo con el aumento del manitol del medio de cultivo en el que se desarrollaron, diferencias en cuanto a la posición de estas en relación al medio de cultivo, siendo el desarrollo radicular, la formación de hojas y su crecimiento las características distintivas del efecto del estrés hídrico en el desarrollo entre cada tratamiento. Las plántulas que crecieron en un medio de cultivo con un potencial hídrico (Ψ_A) de -1.79 MPa, presentaron una posición postrada sobre el medio de cultivo, con crecimiento radicular lento y escaso; llegando a una altura promedio de 11.14 mm, con poco crecimiento foliar, teniendo un promedio de 1.2 hojas por plántula.

Tabla. 4.-Características de las plántulas de *Agave celsii* var. *celsii*, en diferentes potenciales hídricos en condiciones *in vitro*.

Ψ_A medio de cultivo	# de hojas promedio	Altura promedio (mm)	Posición en relación al medio de cultivo
-0.87 Mpa	1,7	32,36	Erectas
-1.58 Mpa	1,4	10,82	Postradas
-1.61 Mpa	1,1	11,43	Postradas
-1.79 Mpa	1,2	11,14	Postradas

Las plántulas que se desarrollaron en el medio de cultivo sin manitol (control), generaron en promedio 1.7 hojas por planta aproximadamente (Figura 6), con una altura de 32.36 mm de alto y un mayor desarrollo radicular (Tabla 4), además de una posición erguida en relación al medio de cultivo; presentaron un cotiledón de color verde intenso de acuerdo con Küppers, (1979) (N₄₀-C₉₉/A₉₀) y después de 4/6 semanas de crecimiento presentaron en el borde indicios de las espinas, las cuales se apreciaron de un color amarillo claro (N₁₀ – C₀₀/A₃₀).

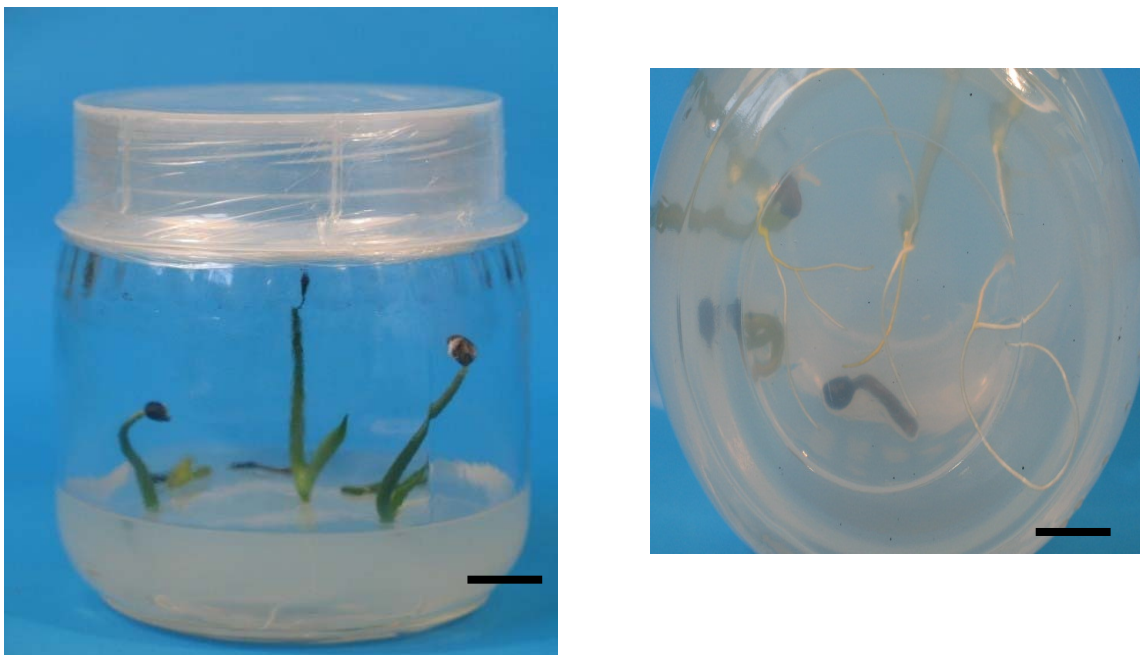


Figura 6.- Plántulas de *A. celsii* var. *celsii* en medio de cultivo MS 100%, sin manitol. Barra = 1 cm.

Para el medio de cultivo con potencial hídrico de -1.58 MPa (Figura 7) las plántulas se desarrollaron postradas sobre este y aunque tuvieron variación en el desarrollo y crecimiento, presentaron un promedio, de 1.4 hojas; sin embargo no mostraron indicios de la formación de espinas en el borde, alcanzando una altura promedio de 10.82 mm, las raíces no tuvieron crecimiento y formación de raíces secundarias y en el caso de presentarlas, estas se desarrollaron sobre el medio de cultivo sin perforarlo, lo que podría justificar su falta de crecimiento ya que al

no tener contacto con los nutrientes del medio estas no fueron abastecidas para lograr su óptimo desarrollo, presentando una coloración verde clorótica ($N_{30}-C_{60}/A_{99}$) de acuerdo con Küppers, (1979), en la parte distal del epicotilo y en algunas partes de las hojas formadas.

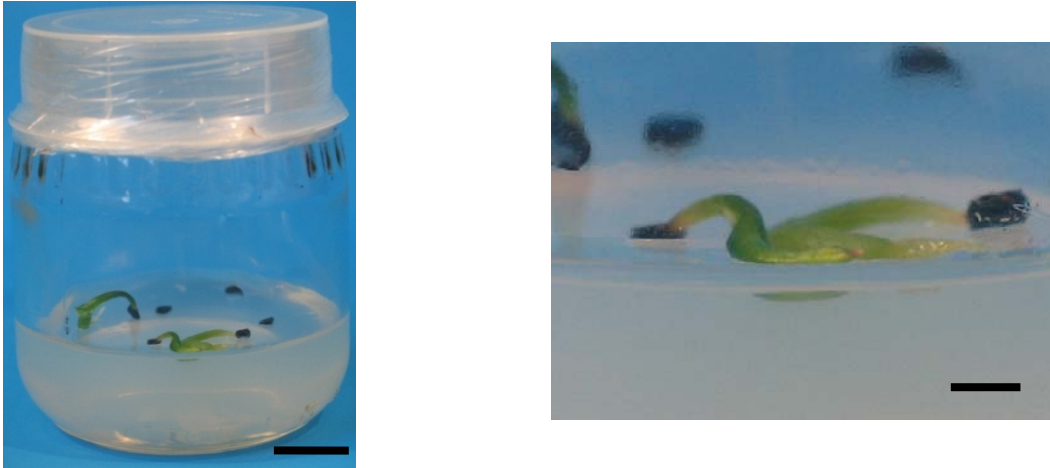


Figura 7.- Plántulas de *A. celsii* var. *celsii* en medio de cultivo MS 100%, adicionado con 75 g/l de manitol. Barra = 1 cm.

Las plántulas que permanecieron en el medio de cultivo adicionado con 85 g/l de manitol ($\Psi_A -1.61$), presentaron escaso crecimiento de raíz, y creciendo postradas sobre el medio de cultivo (Figura 8), tuvieron coloración verde pálido ($N_{30}-C_{80}/A_{99}$) Küppers, (1979), del epicotilo, sin desarrollo de hojas, las cuales escasamente se formaron, sin diferenciación de estructuras en el borde.

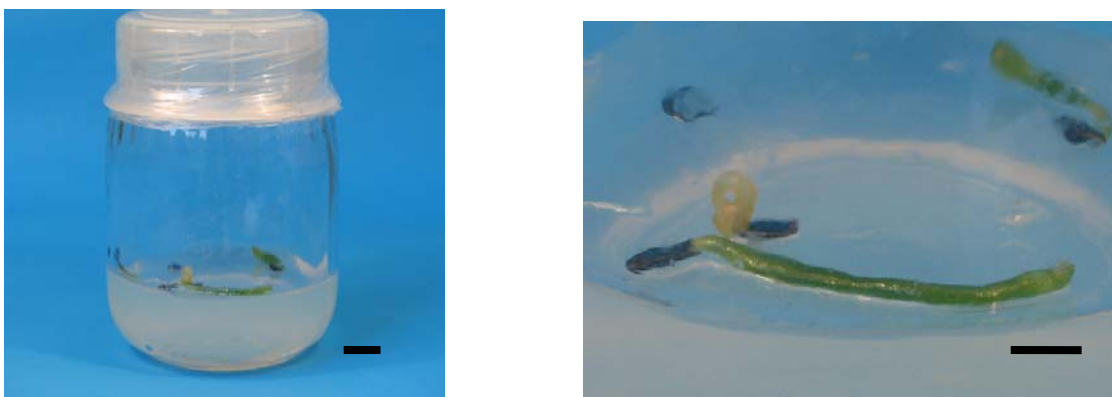


Figura 8.- Plántulas de *A. celsii* var. *celsii* en medio de cultivo MS 100%, adicionado con 85 g/l de manitol. Barra = 1 cm.

El desarrollo de las plántulas que permanecieron en el medio de cultivo adicionado con 105 g/l de manitol (Figura 9), fue muy lento en comparación con las plántulas del medio control *in vitro*, estas presentaron poco crecimiento radicular; con el hipocotilo muy corto y grueso, mientras que el epicotilo fue corto y en algunos casos presento una coloración verde pálido, con tonalidad clorótica en las partes terminales (N₃₀-C₅₀/A₉₉) Küppers, (1979).

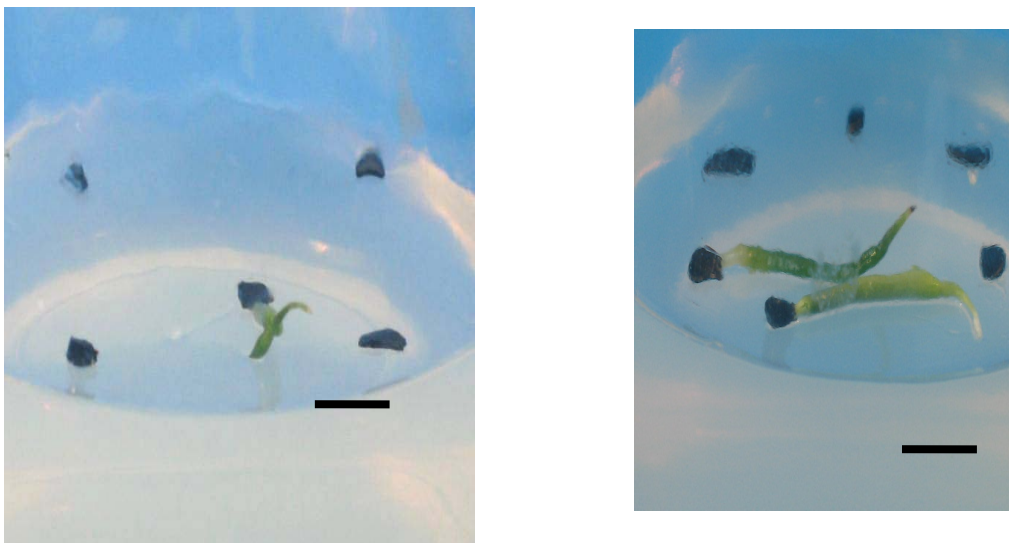


Figura 9.- Plántulas de *A. celsii* var. *celsii* en medio de cultivo MS 100%, adicionado con 105 g/l de manitol. Barra = 1 cm.

TRANSFERENCIA *EX VITRO* Y SOBREVIVENCIA DE LAS PLÁNTULAS

El crecimiento de las plántulas mantenidas en condiciones *in vitro*, puede ser observado en la (Figura 10), donde se aprecian las diferencias entre las plántulas provenientes de cada concentración de manitol en el medio de cultivo; en comparación con las plántulas que estuvieron en medio sin manitol, las cuales llegaron a medir entre 6-7 cm de longitud promedio, generando un sistema radicular, que llegó a medir entre 5-6 cm en promedio, presentando porciones de

las espinas en el borde de las hojas, las cuales se caracterizaban por su tonalidad verde (N₃₀- C₉₀/A₉₉) Küppers, (1979), y blanco en la porción proximal a la raíz.

Las plántulas que fueron transferidas a charolas de poliuretano, presentaron diferencias en la supervivencia y adaptación al cambio de condición *in vitro* a *ex vitro* (Tabla 5). Transcurridos 7 días después del cambio se comenzó a observar un decremento en las plántulas provenientes del medio de cultivo con 105 gr/l de manitol y un potencial hídrico de -1.79 MPa, las cuales no generaron nuevas raíces, para poderse fijar al sustrato y recuperarse del estrés hídrico del que provenían; logrando establecerse solo el 5.3 %, perdiendo el 94% de las plantas que se lograron transferir a suelo.



Figura 10.- Plántulas de *Agave celsii* var. *celsii*, provenientes de los diferentes potenciales hídricos (Ψ_A), generados en condiciones *in vitro*; A) MS 100%, sin manitol, B) MS 100% 75 g/l manitol, C) MS 100% 85 g/l manitol, D) MS 100% 105 g/l manitol

Las plántulas del control (sin manitol) tuvieron más éxito y lograron establecerse el 82.1 %, perdiendo muy pocas plántulas; ya que de 207 plántulas transferidas a tierra solo el 17% no logro establecerse. De acuerdo con Bewley y Black (1994) el movimiento del agua dentro de la semilla es de suma importancia para la germinación, el crecimiento radicular y la emergencia de las plántulas, debido a las características en relación al tamaño y la forma de la semilla, influenciando su área de contacto del suelo, siendo su textura un factor que tiene influencia en el contacto de la semilla y la absorción del agua, permitiendo que de esta manera se altere la imbibición del agua, ya que este proceso depende del potencial hídrico existente entre la semilla y el medio externo en el que se encuentra.

Tabla 5. –Sobrevivencia de las plántulas de *Agave celssi* var. *celsii*, provenientes del medio MS 100% con diferentes concentraciones de manitol.

Ψ_A medio de cultivo	# de plantas transferidas a Suelo	Total plantas Muertas	% plantas Muertas	Plantas establecidas	% sobrevivencia
-0.34 Mpa	49	0	0	49	100.0
-0.87 Mpa	207	37	17.9	170	82.1
-1.58 Mpa	36	17	47.2	19	52.8
-1.61 Mpa	22	14	63.6	8	36.4
-1.79 Mpa	19	18	94.7	1	5.3

En condiciones *ex vitro*, las plántulas provenientes del medio de cultivo con los diferentes potenciales hídricos (Ψ_A), tuvieron respuestas diferentes en cuanto a su establecimiento (Figura 11); ya que las plántulas procedentes del potencial hídrico -1.68 MPa, lograron establecerse satisfactoriamente perdiendo solo 4 plántulas de cada 10 que fueron transferidas a suelo, mientras que las plántulas del potencial hídrico -1.58 de cada 5 pl cada 10 plántulas transferidas, aunque estas presentaron mejor adaptación al cambio en menor tiempo en comparación con las plantas provenientes del potencial -1.60 MPa, que tuvieron un mayor número de plántulas establecidas, pero que tardaron más de 3 semanas en recuperarse.

Debido al estrés hídrico las plántulas de *Agave celsii* presentaron un sistema radicular deficiente, probablemente originado por la deshidratación que generaron al desarrollarse en medio de cultivo con bajo potencial hídrico; lo que coincide con los resultados reportados por Sánchez *et al.* (2004), que evaluaron los efectos del potencial hídrico en el desarrollo de plántulas de *Agave salmiana*, reportando que como en *agave celsii*, el crecimiento del sistema radical y el hipocótilo reflejan los efectos de la falta de agua en el sustrato, aunque *Agave salmiana*, resulta más sensible al déficit hídrico reaccionando de manera negativa a partir de los -0.03 Mpa, mientras que en *agave celsii*, el sistema radicular presenta un mayor daño a partir de potenciales de -1.0 Mpa; estos autores concluyen que los agaves tienen una gran capacidad para mantener hidratadas sus raíces cuando el sustrato solo contiene entre el 6 y 10 % de humedad (-2.35 y 0.65 Mpa); favoreciendo de esta manera su crecimiento,

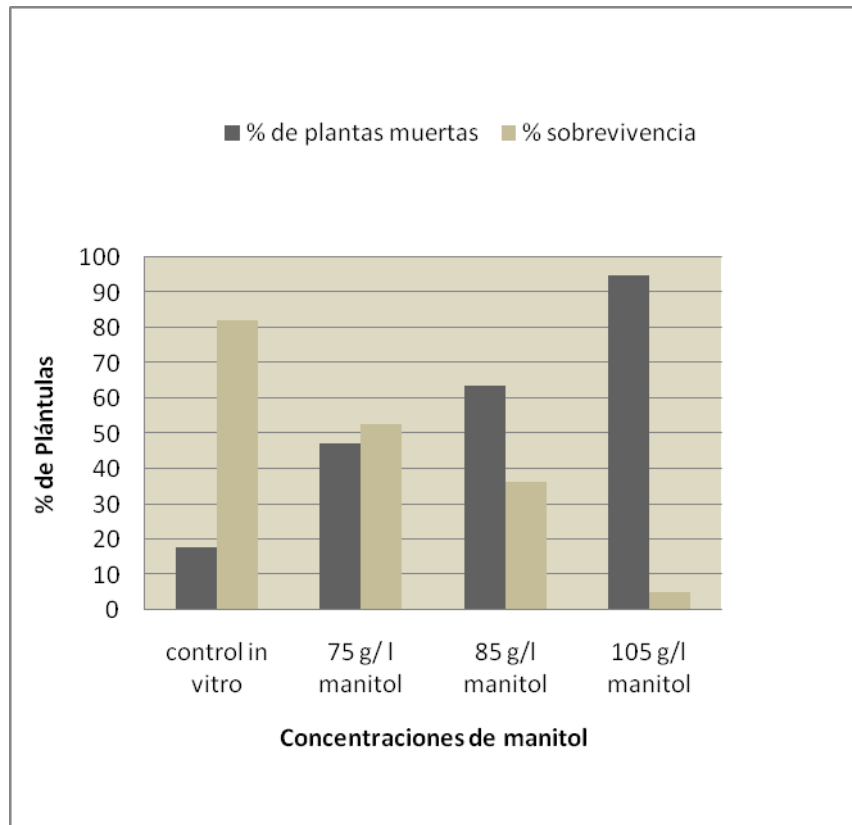


Figura 11.-Porcentaje de plántulas muertas y porcentaje de sobrevivencia de las plántulas de *Agave celsii* var *celsii*, que lograron establecerse en condiciones *ex vitro*.

El desarrollo de la raíz en el crecimiento de las plántulas y a su vez del desarrollo de sus estructuras es de suma importancia, ya que con el crecimiento radicular se asegura que el agua siga transportándose a la plántula permitiendo de esta manera su desarrollo y crecimiento, puesto que las raíces podrían alcanzar capas más profundas del sustrato teniendo acceso a una mayor cantidad de agua y al no desarrollarse, el agua no llena los espacios celulares, lo que origina pérdida de turgencia en los tejidos impidiendo la posición erguida del hipocotílo y posteriormente de las hojas cuando se logran desarrollar y lograr establecerse en el ambiente que les rodea (Nobel *et al.*, 1990; North y Nobel, 1995; Dubrovsky, 1997).

Las plantas, provenientes de cultivo *in vitro* y cultivo *ex vitro* de *Agave celsii* var. *celsii* después de 25 semanas, lograron establecerse en condiciones de invernadero (Figuras 12, 13, 14, 15), las cuales presentaron daños originados por la incidencia solar, dentro del invernadero, originando coloración roja en las hojas formadas. y en algunos casos la desecación ya que algunas plántas no lograron desarrollar un sistema radical eficiente, en comparación con las plantulas del control *ex vitro*. lo cual concuerda con los resultados de Malda y Maqueda (2004) durante la evaluación de magueyes pulqueros *Agave mapisaga* y *Agave salmiana* en condiciones de laboratorio y en invernadero; concluyendo que el cultivo *in vitro* acelera la tasa de crecimiento con y la formación de un número mayor de hojas que los agaves cultivados en condiciones de invernadero, los cuales son pequeños y presentan un menor crecimiento foliar.



Figura 12.- Establecimiento de plantas de *Agave celsii* var. *celsii*, germinadas en condiciones *ex vitro*, presentando crecimiento y desarrollo lento, con coloración rojiza en las hojas debido a la incidencia de la luz del invernadero.

Barra= 2 cm.

Figura 13.-Plantas de *Agave celsii* var. *celsii*, provenientes de condiciones *in vitro*, en medio de cultivo MS sin manitol. Que al mantenerse en condiciones de invernadero se establecieron, desarrollando hojas grandes, anchas y con espinas bien definidas en el borde. Afectadas por el impacto de la luz del invernadero.

Barra = 2 cm.



Figura 14.-*Agave celsii* var. *celsii* procedentes de cultivo *in vitro* en las concentraciones correspondientes a 75 y 85 g/l de manitol, con poco crecimiento en las hojas y sin la formación de espinas definidas en el borde, presentando una coloración rojiza debido a la incidencia luminosa del invernadero.

Barra =2 cm.

Figura 15.- Plántulas de *Agave celsii* var. *celsii* establecidas, provenientes de cultivo *in vitro* en la concentración 105 g/l de manitol; presentando un lento crecimiento foliar, sin desarrollo de espinas en el borde y coloración rojiza generada por la incidencia de luz del invernadero,

Barra = 2 cm.



CONCLUSIONES

El potencial hídrico juega un papel importante en la germinación de las semillas de *Agave celsii* var. *celsii*, generando diferencias significativas entre los porcentajes de germinación en medio de cultivo adicionado con manitol, el control *in vitro* (sin manitol) y el control *ex vitro* (suelo).

El aumento del manitol en el medio de cultivo MS 100% origino potenciales hídricos de -1.58, -1.61 y -1.79 Mpa, retrasando el inicio de la germinación

La disminución de la germinación obtenida en el medio de cultivo, puede ser resultado del manejo durante tren de escarificación y desinfección realizado para la siembra *in vitro*.

Las plántulas de *Agave celsii*, presentaron diferencias morfológicas durante su desarrollo *in vitro*, obteniendo bajos porcentajes de sobrevivencia y establecimiento en condiciones *ex vitro*.

Anexo 1

Resultados estadísticos: Potencial hídrico

Tabla A. Anova de 1 vía para datos de Potencial hídrico; concentración 1 Medio de cultivo (MS) 100%, sin manitol; concentración 2 (MS) 100% adicionado con 75 g/l manitol; concentración 3 (MS) 100% adicionado con 85 g/l manitol; concentración 4 (MS) 100% adicionado con 105 g/l manitol; concentración 5 suelo(*control ex vitro*).

Análisis de varianza de una vía			
Variables:Concentración_1, Concentración_2, Concentración_3, Concentración_4, Concentración_5			
Fuente de variación	Suma	DF	Media
Entre Grupos	81690.55126	4	20422.63781
Infra Grupos	3329.867089	234	14.230201
Total	85020.41835	238	
F = 1435.161561 P < 0.0001			

Tabla B. Prueba de Tukey, comparando la medias de Potencial hídrico, concentración 1 Medio de cultivo (MS) 100%, sin manitol; concentración 2 (MS) 100% adicionado con 75 g/l manitol; concentración 3 (MS) 100% adicionado con 85 g/l manitol; concentración 4 (MS) 100% adicionado con 105 g/l manitol; concentración 5 suelo(*control ex vitro*).

Comparación múltiple de Tukey			
Valor critico = 3.887909, $ q^* = 2.749234$			
Comparación	Diferencia de Medias L (95% CI)	L/SE(L)	
Concentración_1 vs Concentración_3	-23.818926 (-25.935829 a -21.702023)	43.745891	P < 0.0001
Concentración_1 vs. Concentración_4	-32.496876 (-34.613779 a -30.379973)	59.683833	P < 0.0001
Concentración_2 vs. Concentración_3	1.547591 (-0.569312 a 3.664494)	2.842309	P = 0.2645
Concentración_2 vs. Concentración_4	-7.130359 (-9.247262 a -5.013456)	13.095633	P < 0.0001
Concentración_3 vs. Concentración_4	-8.67795 (-10.794853 a -6.561047)	15.937942	P < 0.0001
Concentración_1 vs. Concentración_5	49.523151 (47.395018 a 51.651284)	90.474355	P < 0.0001
Concentración_2 vs. Concentración_5	42.392792 (40.264659 a 44.520925)	77.447828	P < 0.0001
Concentración_3 vs. Concentración_5	40.845201 (38.717068 a 42.973334)	74.620518	P < 0.0001
Concentración_4 vs. Concentración_5	49.523151 (47.395018 a 51.651284)	90.474355	P < 0.0001

Anexo 2

Resultados estadísticos: Germinación

Tabla A. Anova de 1 vía para germinación en semillas de *Agave celsii* var. *celsii*; concentración 1 Medio de cultivo (MS) 100%, sin manitol; concentración 2 (MS) 100% adicionado con 75 g/l manitol; concentración 3 (MS) 100% adicionado con 85 g/l manitol; concentración 4 (MS) 100% adicionado con 105 g/l manitol.

Análisis de varianza de una vía			
Variables: Porcentaje_Concentración_1, Porcentaje_Concentración_2			
Porcentaje_Concentración_3, Porcentaje_Concentración_4			
Fuente de variación	Suma	DF	Media
Entre Grupos	122704.6506	3	40901.5502
Infra Grupos	72039.53778	236	305.252279
Total	194744.1884	239	
F = 133.992612 P < 0.0001			

Tabla B. Prueba de Tukey, comparando las medias del porcentaje de germinación en semillas de *Agave celsii* var. *celsii*; concentración 1 Medio de cultivo (MS) 100%, sin manitol; concentración 2 (MS) 100% adicionado con 75 g/l manitol; concentración 3 (MS) 100% adicionado con 85 g/l manitol; concentración 4 (MS) 100% adicionado con 105 g/l manitol.

Comparación múltiple de Tukey			
Valor critico = 3.659177, $ q^* = 2.587499$			
Desviación Estándar= 17.47147			
Comparación	Diferencia Medias L (95% CI)	L/SE(L)	
%_Concentración_1 vs. %_Concentración_4	54.948955 (46.695471 a 63.202438)	24.361588	P < 0.0001
%_Concentración_1 vs. %_Concentración_3	51.657416 (43.403932 a 59.9109)	22.902287	P < 0.0001
%_Concentración_1 vs. %_Concentración_2	49.464197 (41.210713 a 57.717681)	21.929924	P < 0.0001
%_Concentración_2 vs. %_Concentración_4	5.484758 (-2.768726 a 13.738241)	2.431664	P = 0.3159
%_Concentración_3 vs. %_Concentración_4	3.291539 (-4.961945 a 11.545022)	1.459302	P = 0.7309
%_Concentración_2 vs. %_Concentración_3	2.193219 (-6.060265 a 10.446703)	0.972362	P = 0.9018

BIBLIOGRAFÍA

- ACEVEDO, E., P. SILVA., C. BAGINSKY, Y H. SILVA. 1999. Estreses Abióticos y Producción de los Cultivos. Taller Internacional sobre Quinoa. Proyecto Quinoa del Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú.
- ADEGBUYI, E., S.R. COOPER, Y R. DON. 1981. Osmotic priming of some herbage grass seed using polietilenglicol (PEG). *Seed Science and Technology* 9: 867-78).
- ANDREEV, I. 2001. Functions of the vacuole in higher plants cells. *Plant Physiology* 48 (5): 777-787.
- ARIZAGA, S., Y E. EZCURRA. 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia* 101:329–334.
- _____ 2002. Propagation mechanism in *Agave macroacantha* (Agavaceae). A tropical arid land succulent rosette. *American Journal of Botany* 89: 632-641.
- ÁVILA, M. R., A. L. BRACCINI., C. A. SAPIM., C. A. FAGUARI, Y J. L. DOS SANTOS. 2007. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de Sementes e crescimento de plântulas de canola. *Revista Brasileira de Sementes* 29 (1): 98-106.
- BEWLEY, J. D., Y M. BLACK. 1994. Seeds: physiology of development and germination. 2nd ed. Plenum Press. New York. 445 pp.
- BIDWEL, R. G. S. 2000. Fisiología Vegetal. AGT. Editor. 784 pp.
- BINH, L.T., L. T. MUOI., H. T. K. OANH., T. D. THANG, Y D. T. PONG. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 23: 67-70.
- BRACCCINI, A. L., A. H. RUÍZ., M. C. L. BRACCINI, Y S. M. REIS. 1996. Germinação e vigor de sementes de soja sob estresse hídrico induzido por soluções de Cloreto de Sódio, Manitol. *Revista Brasileira de Sementes* 18 (2):10-16.
- CALDERÓN, R. S. 1987. Etnobotánica de los Agaves del valle del mezquital. Tesis. Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F.
- CANNY, M. 2001. Contributions to the debate on water transport. *American Journal of Botany* 88, 43-46.

- CÁRDENAS, M. A., Y A.V. MONTER. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 25 (2): 213-217.
- CHÁZARO, M., Y P. HERNÁNDEZ. 2006. Maguey el árbol de las maravillas. *Naturalia* 23: 16-22.
- COSTA, P. R., C. C. CUSTODIO., M. N. N. BARBOSA, Y M. O. MASSUO. 2004. Estrese hídrico induzido por manitol em sementes de soja de diferentes tamanhos. *Revista Brasileira de Sementes* 26 (2):105-113.
- DOS-SANTOS, M. V. L., A. C. CALIL., H. A. RUIZ., E. M. ALVARENGA., C. M. DOS-SANTOS. 1992. Efeito do estresse salino e hídrico na germinacao e vigor de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes* 14(2):189-194.
- DUBROVSKY, J. G. 1997. Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae; its organization, cellular basis, and ecological significance. *Planta* 203: 85-92.
- EGUIARTE L. E., V. SOUZA., Y A. SILVA-MONTELLANO. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*. 66: 131-150.
- FANTI, S. C., Y S.C.J.G. DE A. PÉREZ. 2004. Processo germinativo de sementes de paineira sob estresses hídrico e salino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39(9): 903-909.
- FONTÚRBEL, F. 2002. Micropropagación de un cultivo prene. El portal de la biología y ciencias de la salud. En: [http://www. Biologia.org/ revista/pdfs/47.pdf](http://www.Biologia.org/revista/pdfs/47.pdf). Consulta, Octubre. 2007.
- FREEMAN, C.E. 1973. Some germination responses of Lechuguilla (*Agave lechuguilla*.) *Southwestern Naturalist* 18(2): 125-134.
- _____ 1975. Germination responses of a New México population of *Agave parryi* var. *parryi*, to Constant temperature, water stress, and pH. *Southwestern Naturalist* 20(1):69-74.
- FREITAS, M. G. A., Y M. N. LEMOS. 2003. Desempenho de sementes de soja sob condicoes diferentes de potencial osmótico. *Ciencia Rural* 33(2): 1-11.
- GARCÍA-MENDOZA, A., Y R. GALVÁN. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Noliaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 56:7-24.

- GARCÍA-MENDOZA, A. 2002. Distribution of Agave (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 74(4): 177-187.
- GENTRY, H. S. 1972. The Agave family in Sonora. Department of agriculture. Washington. D. C. 195 pp.
- GENTRY, H. S. 1982. Agaves of continental North America. University of Arizona Press, Tucson, Arizona. 670 pp
- GOBIERNO DEL ESTADO DE HIDALGO. 1988. El maguey: el árbol de las maravillas. Museo natural de culturas populares. México. 178 pp.
- GÓMEZ, P. A. 1963. El género *Agave*. *Cactaceas. Suculemtas. Mexicanas* 8(1): 3-25.
- GONZÁLEZ, G., S. ALEMÁN., F. BARREDO, Y M. L. ROBERT. 2001. Embriogénesis somática en *Agave fourcroydes*. *Biotecnología vegetal* 2(1):3-8.
- GONZÁLEZ, G. A. 2005. Biología reproductiva y genética de poblaciones de *Agave garciae-mendozae*. Tesis. Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F.
- GRANADOS, S. D. 1999. Agaves en México. UACH. México. 251 pp.
- HARZA, S. K., S. DAS, Y A. K. DAS. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 70: 235-240.
- IRISH, M., Y G. IRISH. 2000. Agaves. Yuccas and related plants. Timber Press. Portland. Cambridge. 312 pp.
- JAIN, N., Y S. B. BABBAR. 2002. Gum Katira- a cheap gelling agent for plant tissue culture media. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 71: 223-229.
- JORDAN, P. W., Y P. S. NOBEL. 1979. In frequent establishment of seedlings of *Agave deserti* (Agavaceae) in the North-western Sonoran Desert. *American Journal of Botany* 66(9): 1079-1084.
- KÜPPERS, H. 1979. Atlas de los colores. Blume. Barcelona. 161 pp.
- LARCHER, W. 2003. Physiological plant ecology. 4^a ed. Springer. Germany. 231 pp.
- LÓPEZ. S. C. 1989. Principales enfermedades que afectan *Agave angustifolia* y *Agave americana* en el distrito de Tlacolula Oaxaca. Tesis. Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. México, D.F.

LOT, A., Y F. CHIANG. 1986, Técnicas especiales de recolección y preparación de ejemplares de grupos de plantas. Consejo Nacional de la Flora de México, A.C. México, D.F.

MALDA, B.G., H. SUZÁN, Y R. BACKHAUS.1999. *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae* (81) 71: 87.

MALDA, B. G., Y M. MAQUEDA. 2004. Comparación del crecimiento de magueyes pulqueros (*Agave salmiana* y *Agave mapisaga*.) bajo esquemas de propagación *in vitro* y condiciones de invernadero. *Biología Scripta* 1 (1):1-6.

MALDONADO, C.; E. PUJADO, Y F. A. SQUEO. 2002. Efecto de la disponibilidad de agua durante el crecimiento de *Lycopersicon chilense* sobre la capacidad de sus semillas para germinar a distintas temperaturas y concentraciones de manitol y NaCl. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 651-660.

MARTÍNEZ, M. A., Y J. C. PACHECO. 2006. Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. *Agronomía Colombiana* 24(2) 207:213.

MARTÍNEZ, P. A., Y A. V.M CHÁVEZ. 1996. Reporte final: Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae* y aplicación de cultivo de tejidos para su conservación. Proyecto CONABIO. Jardín Botánico, IB-UNAM pp.28

MARTÍNEZ, P. A., M. L. P. ORTEGA., V. CHÁVEZ, Y R. BYE. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: considerations for its conservation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 74: 135-142.

MUÑOZ, P. Y., L. A. PÉREZ., T. S. PÉREZ., P. ALCANTARA., M. SAGRERA, Y C. PIMENTEL. 2004. Metodología para el mejoramiento genético del henequén (*Agave fourcroydes*.) con el empleo de técnicas biotecnológicas. En: http://bioplantas.cu/bioinformática/taller_04_BV.pdf. Consulta, septiembre, 2007.

MURASHIGE, T., Y F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum* 15: 473-493.

NIKAM, T.D. 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell Tissue Organ culture* 51: 225-228

NIKAM, T. D., G. M. BANSUDE., Y K. C. A. KUMAR. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana*). *Plant Cell Reports* 22: 188-194.

- NOBEL, P. S. 1988. Environmental biology of agaves and cacti. Los Angeles, Cambridge University Press. pp.189.
- NOBEL, P. S., J. SCHULTE, Y G. B. NORTH. 1990. Water influx characteristics and hydraulic conductivity for roots of *Agave deserti*. *Journal of Experimental Botany* 41: 409-415.
- NOBEL, P. S. 1998. Los incomparables Agaves y Cactus. Trillas. México. pp.211.
- NORTH, G.B., Y P. S. NOBEL. 1991. Changes in hydraulic conductivity and anatomy caused by drying and rewetting roots of *Agave deserti* (Agavaceae) *American Journal of Botany* 78: 906-915.
- NORTH, G.B., Y P.S. NOBEL. 1995. Hydraulic conductivity of concentric root tissues of *Agave deserti*. Under wet and drying conditions. *American Journal of Botany* 130: 47-57.
- OTEGUI, M., C. SOROL., A. FLECK, Y G. KLEKAILO. 2007. Madurez fisiológica, germinación y conservación de semillas de Guayabito (*Psidium cuneatum*). *Revista Brasileira de Sementes* 29(3)142-150.
- PALLAS, J. E., J. R. STANSELL, Y R. R. BRUCE. 1977. Peanut seed germination as related to soil water regime during pod development. *Agronomy Journal* 69: 381-383.
- PALLEIRO, N. 2001 Propagación vegetativa a través de frutos abortados de *Opuntia microdasys* en el desierto chihuahuense. Tesis. Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F.
- PRITCHARD H, W., Y P. MILLER. 1995. The effects of constant temperatures, light and seed quality on the germination characteristics of *Agave americana*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 57:11-14.
- POWERS, D. E., Y R. A. BACKHAUS. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 16: 57-60.
- RAMÍREZ, J. 1995. Los magueyes, plantas de infinitos usos. *Biodiversitas* 1(3)2-6
- RODRÍGUEZ, G. B., M. A. GUTIERREZ, Y D. B. ACOSTA. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoriae-reginae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 46: 85-87.
- RODRÍGUEZ, P. L. 2006. Implicaciones fisiológicas de la osmorregulación en plantas. *Agronomía Colombiana* 24(1): 28-37.

- ROSAS, L. U. Y. 2002. Anatomía fisiológica de plántulas de cactáceas bajo estrés hídrico. Tesis. Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F.
- SALISBURY, B. F., Y C. W. ROSS. 1994. Fisiología vegetal. Editorial. Interamericana. México. 759 pp.
- SÁNCHEZ-URDANETA, A. B., C. B. PEÑA-VALDIVIA., J. R. AGUIRRE., C. TREJO, Y E. CÁRDENAS. 2004. Efectos del potencial de agua en el crecimiento radical de plántulas de *Agave salmiana*. *Interciencia* 29(11): 626-631.
- SANTACRUZ, R. F., P. H. GUTIÉRREZ, Y G. B. RODRÍGUEZ. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 56: 163-167.
- SCHAFFER, W.M., Y M. V. SCHAFFER. 1977. The reproductive biology of Agavaceae: Pollen and nectar production in four Arizona agaves. *Southwestern Naturalist* 22:157-168.
- STEUDLE, E. 2000. Water uptake by roots: effects of water deficit. *Journal of Experimental Botany* 51(350), 1531-1542.
- TAMBUTTI, A. M. I. 2002. Diversidad del género *Agave* en México: una síntesis. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. México, D. F.
- VILLAVICENCIO, M. A., B. E. PÉREZ-ESCANDON, Y A. RAMÍREZ-AGUIRRE. 1998. Lista florística del Estado de Hidalgo, Recopilación Bibliográfica. UAEH. México. 147 pp.
- YÉPEZ, G. E. Y E. VARGAS. 2004. Notas preliminares sobre La propagación clonar *in vitro* de *Agave cocui*. En <http://www.investigacion.unefm.edu.ve/pdf>. Consulta junio 2007
- ZHU, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Plant Physiology* 53: 247-273.
- _____ 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Plant Biology* 6:141-145.
- ZYALALOV, A. 2004. Water flows in higher plants: physiology, evolution, and system analysis. *Journal of Plant Physiology* 51(4), 547-555.