

PROPAGACIÓN *in vitro* DEL 'MAGUEY BRUTO' (*Agave inaequidens* Koch), UNA ESPECIE AMENAZADA DE INTERÉS ECONÓMICO

F. Aureoles-Rodríguez¹; J. L. Rodríguez-de la O²;
J. P. Legaria-Solano²; J. Sahagún-Castellanos²;
M. G. Peña Ortega²

¹Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro". Unidad Saltillo.
Departamento de Horticultura.
Buenavista, Saltillo, Coahuila. MÉXICO. C. P. 25315.
Correo-e: fabyaureoles@yahoo.com.mx. (¹Autor responsable).
²Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.
Km. 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México,
C. P. 56230. MÉXICO.

RESUMEN

El 'Maguey bruto' (*Agave inaequidens* Koch) es una especie silvestre poco estudiada que se encuentra amenazada y se utiliza para la elaboración de la bebida alcohólica "Raicilla". Con la finalidad de propagar *in vitro* la especie, se evaluaron diferentes tipos de explantes, tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento y concentraciones de sales inorgánicas Murashige y Skoog (1962), así como, diferentes tamaños de planta y cantidades de raíz. El análisis de datos detectó diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) entre los efectos de los niveles de algunos factores y algunas interacciones. Las secciones de tallo formaron hasta 72 brotes en ocho semanas; la concentración de 3.0 mg·litro⁻¹ de 6-benciladenina (BA) produjo una mayor longitud y número de brotes con 6.39 mm y 2.02, respectivamente; las concentraciones de BA, Kinetina (Kin) y 6- γ , γ -dimethylallylamino purina (2ip) produjeron una amplia variedad de respuestas; el tamaño grande de plantas en un medio con sales MS al 100 % de su concentración sin reguladores, produjo mayor número y longitud de raíces en menor tiempo, y las plantas de longitud mayor a 4.0 cm con más de dos raíces presentaron una sobrevivencia del 100 %.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: raicilla, bebida alcohólica, citocininas, cultivo *in vitro*.

In vitro PROPAGATION OF 'MAGUEY BRUTO' (*Agave inaequidens* Koch), AN ENDANGERED SPECIES WITH ECONOMICAL INTEREST

ABSTRACT

'Maguey bruto' (*Agave inaequidens* Koch) is a wild, little studied endangered species. It is used to make the alcoholic spirit "Raicilla". To develop a method for reproduction to increase the population, several explants, concentrations of hormone, inorganic Murashige and Skoog (1962) salts, plant sizes and root conditions were evaluated *in vitro*. Some variables showed statistical significance. The stem sections formed 72 shoots in 8 weeks; the concentration of 3.0 mg·liter⁻¹ of 6-benzyladenine (BA) produced an increase in length and number of shoots (6.39 mm and 2.02 respectively). The concentration of BA, kinetin (Kin) and 6- γ , γ -dimethylallylamino purine (2ip) produced a wide variety of responses: larger plants in a medium with MS salts at 100 % concentration produced more and larger roots in less time, and 100 % of the plants larger than 4.0 cm with more than 2 roots survived.

ADDITIONAL KEY WORDS: raicilla, alcoholic spirit, cytokinins, tissue culture.

INTRODUCCIÓN

En la región Oeste del estado de Jalisco se produce la bebida alcohólica "Raicilla", producto de un proceso de destilación que se conoce desde la época Colonial. La producción de raicilla fue hasta el año 2000 una práctica ilegal, por ello su producción aún es artesanal. Un estudio reciente estima que se obtienen entre 20 y 25 mil litros al año y en un futuro muy próximo este volumen puede incrementarse notablemente.

La materia prima para la elaboración de la raicilla se obtiene de dos especies silvestres de agave. Una de ellas es *Agave inaequidens* Koch ('Maguey bruto' o 'Lechuguilla') que se puede encontrar distribuida desde las zonas montañosas del estado de Jalisco hasta Morelos y el Distrito Federal (Gentry, 1982; Anónimo, 2003).

Algunos productores y empresarios están conscientes del enorme potencial de la bebida pero se están enfrentando al gran problema de que no hay planta para procesar. Como la raicilla tiene una calidad similar a la del tequila y a la del mezcal, ha sido objeto de depredación; un ejemplo de ello se presentó en el periodo de 1999 a 2001, en que, ante la escasez y encarecimiento de *A. tequilana* (para la industria tequilera) muchos intermediarios arrasaron con otros tipos de agave (Anónimo, 2003). Otro de los problemas que presenta esta especie ocurre en su multiplicación, que se realiza mediante hijuelos (estolones), bulbillos o semillas (Madrigal y Díaz, 1991). Una planta adulta de agave generalmente forma 1 a 2 hijuelos al año y cuando llega a formar semillas, éstas no son viables en su totalidad o no germinan por exponerse a condiciones ambientales adversas. Una planta para madurar demora entre 8 y 27 años, y ocasionalmente, no llega a esta etapa por la incidencia de plagas y enfermedades o por cosecharse antes de tiempo (Gentry, 1982; Granados, 1993; Melda y Ruíz, 2004).

Una de las estrategias que permite el rescate, la conservación y multiplicación de especies amenazadas o en peligro de extinción es el empleo del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales. Esto se ha demostrado en trabajos de investigación como el realizado con *Agave parrasana* Berger (Santacruz *et al.*, 1999) en que, gracias a estas técnicas, se logró micropropagar exitosamente. En otras especies de agave que aún no se encuentran amenazadas o en peligro de extinción como: *A. cantala* Rob. (Binh *et al.*, 1990), *A. fourcroydes* Lem. (Robert *et al.*, 1987; Binh *et al.*, 1990), *A. schidigera*, *A. sisalana* Perrine (Binh *et al.*, 1990; Das 1992), *A. victoria-reginae* Moore (Rodríguez y Acosta, 1996), *Agave arizonica* Gentry (Powers y Backhaus, 1989), *A. salmiana* Otto ex. Sal y *A. mapisaga* Trel. (Melda y Ruíz, 2004) estas técnicas se han aplicado exitosamente.

Bajo este contexto, el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de diferentes explantes, concentraciones de

reguladores de crecimiento y sales inorgánicas MS; tamaños de planta y cantidades de raíz, en la propagación *in vitro* de *A. inaequidens* Koch.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del material vegetal, obtención de explantes y desinfectación

El material vegetal utilizado para la investigación se obtuvo de una colecta de plantas de *A. inaequidens* Koch de tres años de edad en la comunidad de Santiago de Pinos municipio de San Sebastián del Oeste, Jalisco. Las plantas se llevaron a un invernadero en la Universidad Autónoma Chapingo, donde se establecieron en macetas y se desinfectaron aplicando en el riego fungicida y bactericida de tipo sistémico. Para obtener explantes, se eliminaron de las plantas las hojas viejas y raíces dejando sólo la "piña" (cuerpo central de la planta) de la cual se aislaron las yemas axilares y el tejido del tallo. Los explantes obtenidos se lavaron y desinfectaron cuidadosamente con agua, jabón, tween 60 y agua estéril. Posteriormente se sumergieron durante 3 min en alcohol al 70 %, luego en hipoclorito de sodio al 10 % durante 3 a 5 min y, por último, en antioxidante (150 mg·litro⁻¹ de ácido cítrico y 100 mg·litro⁻¹ de ácido ascórbico) durante 5 min. El tejido del tallo después del tratamiento anterior fue cortado en discos de aproximadamente 3 a 4 mm de grosor.

Establecimiento *in vitro*

Los explantes fueron sembrados en frascos de 5.5 x 6.8 cm en un medio formulado con sales MS y con 80 mg·litro⁻¹ de sulfato de adenina, 0.40 mg·litro⁻¹ de tiamina, 100 mg·litro⁻¹ de mio-inositol, agar al 0.7 % (p/v) y azúcar al 3 % p/v. Como reguladores de crecimiento se utilizaron 0.3 mg·litro⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) y 10 mg·litro⁻¹ de BA, y el pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1. Los explantes permanecieron en un área de incubación por un periodo de 8 a 27 semanas, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad, una temperatura de 26 ± 2 °C y una intensidad lumínica de 10 a 15 µmol·m⁻²·s⁻¹.

Todos los medios de cultivo, los instrumentos de disección y otros materiales de vidriería fueron esterilizados en una autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 1.5 kg·cm⁻² (20 lb·pie⁻²); los medios de cultivo fueron esterilizados durante 25 min y los instrumentos de disección y materiales de vidriería durante 45 min.

Multiplicación

En esta etapa se realizaron dos experimentos: el primero, con el fin de promover el desarrollo individual de brotes obtenidos en el establecimiento, para ello se utilizaron brotes o propágulos de 1.0 a 2.0 cm que fueron sembrados en un medio con las sales MS y con 80 mg·litro⁻¹ de sulfato de adenina, 0.40 mg·litro⁻¹ de tiamina y 100 mg·litro⁻¹ de mio-inositol; como regulador de crecimiento se utilizaron

cinco diferentes concentraciones de BA (0.0, 0.1, 1.0, 3.0, y 10.0 mg·litro⁻¹). La siembra se realizó en tubos de ensaye de 15 x 150 mm con 15 ml de medio, según el diseño experimental completamente al azar con 11 repeticiones. La unidad experimental fue un tubo de ensaye con dos brotes o propágulos. Las variables evaluadas fueron altura de plántula, número de hojas y vigor. Éste fue evaluado visualmente, dando valores de 1 a 3, con base en el color y presencia de tejido sano; a brotes de color brillante o vivaz y sin tejido dañado se les asignó el 3, mientras que a la presencia de tejidos débiles y de coloración oscura, el valor asignado fue el 1.

En el segundo experimento, se sembraron brotes con poda de hojas en tubos de ensaye con un medio con sales MS y con vitaminas WS (Wetmore y Sorokin, 1955) y 60 mg·litro⁻¹ de sulfato de adenina. Como reguladores de crecimiento se utilizaron las citocininas BA, Kin y 2ip en las concentraciones de 3.0 y 10.0 mg·litro⁻¹. El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con arreglo factorial 3 x 2 y 12 repeticiones. Las variables evaluadas fueron: altura de plántula, número de hojas, número de brotes, plántulas con formación de estructura globular o con raíz. Las dos últimas variables se evaluaron calculando el porcentaje de repeticiones con este tipo de estructuras.

La intensidad lumínica manejada en los dos experimentos anteriores fue de 20 a 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Enraizamiento

Para promover el enraizamiento se probaron tres medios de cultivo y tres tamaños de planta. Uno de los medios se formó con las sales inorgánicas MS al 100 % de su concentración, otro con las sales MS al 100 % de su concentración + 0.3 mg de 2ip, y el tercero con las sales MS al 50 % de su concentración. Los tamaños de planta estudiados fueron: planta chica (0.8 a 2.8 cm), planta mediana (2.9 a 3.7 cm) y planta grande (3.8 a 6.8 cm). Además de los tratamientos, en el medio de cultivo se adicionaron como suplementos 60 mg·litro⁻¹ de sulfato de adenina, vitaminas WS, 3 % (p/v) de azúcar y agar al 0.7 % (p/v) y el pH fue ajustado a 5.7 ± 0.1 . El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con arreglo factorial 3 x 3 con 10 repeticiones. Las variables evaluadas fueron número y longitud de raíces. La intensidad lumínica fue de 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Transferencia a sustrato e invernadero

Las plantas enraizadas del cultivo *in vitro* fueron sembradas en vasos de unicel con una mezcla de sustrato compuesta de peat moss (60 %) y perlita (40 %) en un invernadero. Para aclimatar las plantas, las macetas fueron colocadas en bolsas de plástico que fueron cerradas herméticamente por un periodo de tres semanas. En la última, las bolsas se abrieron poco a poco hasta retirarlas completamente. Los tratamientos se formaron utilizando los

tamaños de planta: chico (2.5 cm), mediano (4.0 cm) y grande (6.4 cm), y dos condiciones de raíz: poca (2 a 5 raíces) o mucha (7 a 9 raíces). La variable evaluada fue porcentaje de sobrevivencia, que se obtuvo contabilizando el número de plantas vivas. La unidad experimental fue una planta y el número de repeticiones fue 10.

Análisis estadísticos

En este trabajo de investigación los datos de los diseños experimentales antes descritos fueron sometidos al análisis de varianza ($P \leq 0.05$) y a comparaciones de medias (Tukey $P \leq 0.05$) utilizando el paquete computacional SAS versión 8 (Universidad Complutense de Madrid, 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento *in vitro*

Por carecer de información sobre el manejo *in vitro* del 'Maguey Bruto' (*A. inaequidens* Koch), la estrategia experimental para promover la brotación de forma directa (sin formación de callo) fue probar diferentes tipos de explante para evaluar las respuestas morfogénicas *in vitro* utilizando yemas axilares y secciones de tallo. Las secciones de tallo presentaron brotación múltiple después de ocho semanas, llegando a formar u obtener hasta 78 brotes (Figura 1a). Por su parte, las yemas axilares en 27 semanas formaron alrededor de 54 brotes. Robert *et al.* (1987) y Das (1992) reportaron la formación directa de brotes adventicios de agave utilizando tejido de tallo. Mientras que Binh *et al.* (1990) obtuvieron lo mismo utilizando tejido meristemático. Lo anterior sugiere que cuando se pretenda establecer el cultivo *in vitro* de una especie nueva de agave, se debe partir con la siembra de estos tipos de tejido.

Multiplicación

En el experimento donde se probaron cinco concentraciones de BA en el medio de cultivo para promover el desarrollo individual de los brotes de *A. inaequidens* Koch, se encontró significancia estadística ($P \leq 0.05$) en las variables altura de planta y número de hojas. Los resultados de este experimento indican que los tratamientos probados incrementaron el tamaño de planta y el número de hojas, las mejores respuestas estadísticas se encontraron con las concentraciones de 1.0 y 3.0 mg·litro⁻¹ de BA (Cuadro 1). Los brotes adquirieron la forma característica de roseta aunque no incrementaron estadísticamente su vigor (Cuadro 1 y Figura 1b). Jankiewicz (2003) menciona que las citocininas generan cambios morfológicos en los tejidos cultivados *in vitro*, resultado del estímulo de la actividad mitótica celular, lo que genera brotación, y explica los resultados obtenidos. En esta parte del trabajo de investigación se presentó brotación pero fue difícil determinar el número exacto de brotes porque presentaron una forma similar a las hojas en su inicio. Aún con ello, los tratamientos

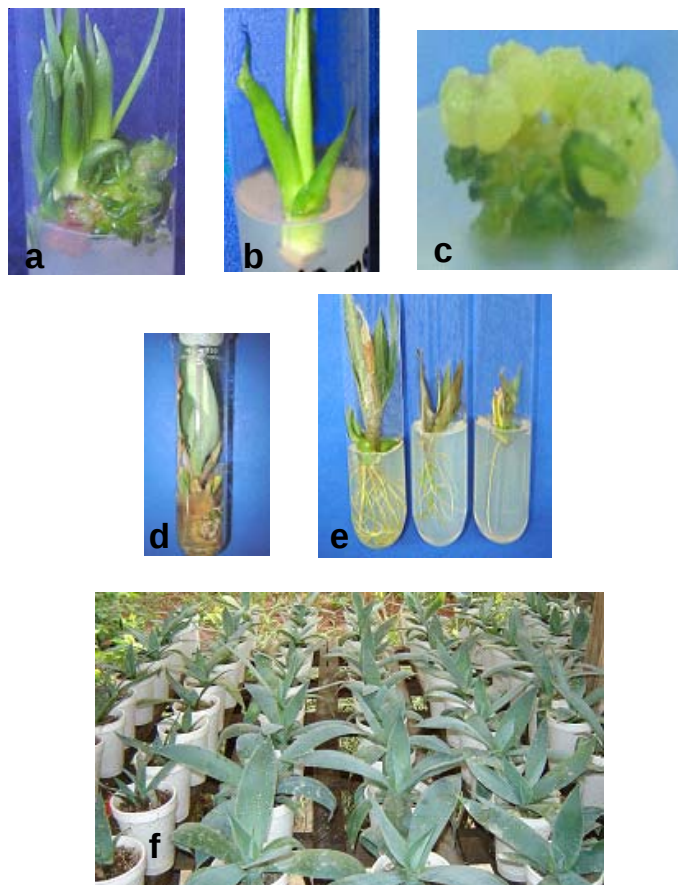


FIGURA 1. a) Brotación múltiple en secciones de tallo; b) Brote tratado con 3.0 mg·litro⁻¹ de BA; c) Estructura globular; d) Planta tratada con 3.0 mg·litro⁻¹ de Kin, e) Tres tamaños de plantas enraizadas con sales MS al 100 % y sin reguladores; f) Plantas con seis meses de transferencia a sustrato.

CUADRO 1. Comparación de medias y significancia estadística de las variables de crecimiento y vigor de *A. inaequidens* Koch seis semanas después de la siembra en medios de cultivo con cinco concentraciones de BA.

BA (mg·litro ⁻¹)	IAP (mm)	INH	Vigor (Escala 1,2 y 3) ^z
0.0	2.18 b ^y	0.56 b	1.36 a
0.1	2.91 ab	1.10 ab	1.64 a
1.0	5.53 ab	2.04 a	2.09 a
3.0	6.39 a	2.02 a	2.27 a
10.0	2.50 ab	1.52 ab	1.95 a
C. V.	82.86	64.4	43.53
Significancia ^w	*	*	NS

^zIAP: Incremento en altura de planta; INH: Incremento en el número de hojas; V: vigor.

^y1: Bajo vigor; 2: mediano vigor; 3: alto vigor.

^xMedias con la misma letra dentro de una columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey, a una $P \leq 0.05$.

^w*, *: estadísticamente significativo.

^{NS}: no significativo con $P \leq 0.05$.

con BA propiciaron la formación de 1 a 2 brotes en las plantas más vigorosas. Santacruz *et al.* (1999) en *A. parrasana* y Das (1992) en *A. sisalana* también promovieron la brotación cuando adicionaron en el medio de cultivo la citocinina BA en diferentes concentraciones.

En el análisis de varianza del experimento en que se probaron tres tipos de citocininas en dos concentraciones, se observó significancia estadística ($P \leq 0.05$) en las variables estudiadas. Se observó que la interacción de los reguladores de crecimiento y las concentraciones afectaron las variables altura de planta y el número de hojas. Los valores más altos para la variable altura de planta se encontraron con 3.0 mg·litro⁻¹ de Kin, mientras que para la variable número de hojas los valores más altos se encontraron con 3.0 mg·litro⁻¹ de BA y 10.0 mg·litro⁻¹ de Kin. La variable número de brotes únicamente resultó afectada por la concentración de los reguladores, los valores más altos se encontraron con la concentración de 10.0 mg·litro⁻¹ independientemente del tipo de regulador (Cuadro 2). También, la aplicación de tratamientos propició la formación de estructuras globulares (Figura 1c) y la formación de raíz (Cuadro 3 y Figura 1d). Por otra parte, se determinó que *A. inaequidens* Koch crece y se desarrolla mejor en tubos de ensaye. En recipientes más anchos como los frascos de 5.5 x 6.8 cm se favorece el crecimiento de hojas alteradas morfológicamente, y conforme van creciendo separan a la planta del medio de cultivo evitando con ello el correcto suministro de nutrientes *in vitro*.

Las estructuras globulares consideradas como formas preliminares de una brotación múltiple, se formaron en la base de las plántulas y con un medio de cultivo con sales MS al 100 % + 1.0 mg·litro⁻¹ de BA y con vitaminas WS se propició la diferenciación y obtención de nuevos brotes, ocasionando con ello un incremento muy alto en la producción de plantas. Como el objetivo de la investigación fue la preservación, se dio preferencia a la multiplicación por vía directa y no se consideró esta posibilidad como una estrategia de multiplicación porque hay riesgo de obtener nuevas variantes. Robert *et al.* (1987) reportaron también la presencia de callo altamente caulogénico en *A. fourcroydes*, Lem., el cual, en un medio de cultivo adecuado, pudo diferenciar y formar nuevos brotes incrementando exponencialmente la producción.

Con relación a la formación de raíz, se tiene conocimiento de que las citocininas inhiben la formación y el crecimiento de raíces (Salisbury y Ross, 1994; Kende y Zeevaart, 1997; Jankiewicz, 2003). Sin embargo, en este experimento, esto se cumplió sólo con el regulador BA y no con Kin y 2ip. Pareciera que estos dos últimos reguladores fueron responsables de la formación y crecimiento de raíces, pero es posible que éstos produjeron un efecto nulo, y la formación y crecimiento de raíz que se presentó, fue resultado de la presencia de auxinas generadas por la misma planta ya que éstas se han reportado como promotoras de la formación y crecimiento de raíces (Salisbury y Ross, 1994; Kende y Zeevaart, 1997; Jankiewicz, 2003).

CUADRO 2. Comparación de medias y significancia estadística de las variables de crecimiento de *A. inaequidens* Koch nueve semanas después de la siembra en medios de cultivo con tres reguladores de crecimiento y dos concentraciones.

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

²AP: altura de planta; NH: número de hojas; NB: número de brotes.

^yMedias de los niveles de los factores con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

*: NS: no significativo.

*: significativo con una $P \leq 0.05$.

CUADRO 3. Porcentaje de plántulas con estructura globular y plantas con raíz en *A. inaequidens* Koch nueve semanas después de la siembra en medios de cultivo con tres reguladores de crecimiento y dos concentraciones.

Regulador	Concentración mg·litro ⁻¹	PEG (%)	PR (%)
BA	3.0	28.6	0
	10.0	14.3	0
KIN	3.0	14.3	71.43
	10.0	0	100
2ip	3.0	0	100
	10.0	0	100

²PEG: porcentaje de estructura globular; PR: porcentaje de raíz.

Enraizamiento

Para propiciar la formación de raíz *in vitro* en diferentes especies de agave, se han utilizado medios de cultivo con bajas concentraciones de sales MS y AIB (Enríquez *et al.*, 2005). También se han utilizado medios con sales MS al 100 % de su concentración y sin reguladores de crecimiento (Binh *et al.*, 1990; Rodríguez y Acosta, 1996; Santacruz *et al.*, 1999). En el análisis de este experimento se encontró significancia estadística ($P \leq 0.05$) en los factores medio de cultivo y tamaño de planta (Cuadro 4), la interacción medio de cultivo x tamaño de planta no mostró significancia estadística ($P \leq 0.05$). El incremento en el número de raíces en función del tiempo, expresado en tamaño de planta y tipo de medio de cultivo es considerable; los tamaños mediano y grande se comportaron estadísticamente de forma similar siendo el más favorecido el grande (Figura 1e). Por el contrario, el chico difiere estadísticamente de los otros dos y se ve menos favorecido, especialmente con los medios MS al 50 % y MS al 100 % + 3.0 mg·litro⁻¹ de 2ip (Figuras 2 y 3). Todos los tamaños de plantas con el tratamiento MS al 100 % + 3.0 mg·litro⁻¹ de 2ip formaron raíces menos numerosas y más cortas, a diferencia de lo que produjeron los tratamientos sin regulador.

Transferencia a sustrato

En la transferencia a sustrato, los resultados mostraron que sólo las plantas chicas con pocas raíces no produjeron el 100 % de sobrevivencia (Cuadro 5, Figura 1f). Das (1992) en *A. sisalana* Perrine reportó un rango de sobrevivencia del

CUADRO 4. Comparación de medias y significancia estadística de las variables de crecimiento de raíz de *A. inaequidens* Koch seis semanas después de la siembra en tres tamaños de planta en tres medios de cultivo.

Factores	NR ²	LR
Medio de cultivo (MC)		(cm)
MS 100 %	5.47 a ^y	4.87 a
MS 50 %	4.40 ab	3.76 a
MS 100 % + 3.0 mg·litro ⁻¹ de 2ip	2.63 b	1.45 b
Tamaño de planta (TP)		
Chica	2.07 b	2.51 b
Mediana	4.30 a	3.34 ab
Grande	6.13 a	4.24 a
CV	84.85	63.85
Tamaño de planta (TP)	* ^x	*
Medio de cultivo (MC)	*	*
TP x MC	NS	NS

²NR: número de raíces; LR: longitud de raíz.

^yMedias de los niveles de un factor con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

*: NS: no significativo.

*: significativo a una $P \leq 0.05$.

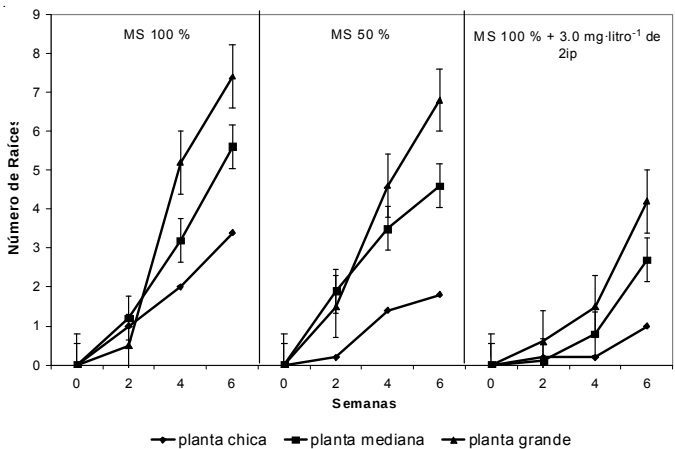


FIGURA 2. Número de raíces en un periodo de seis semanas para tres medios de cultivo y tres tamaños de planta de *A. inaequidens* Koch.

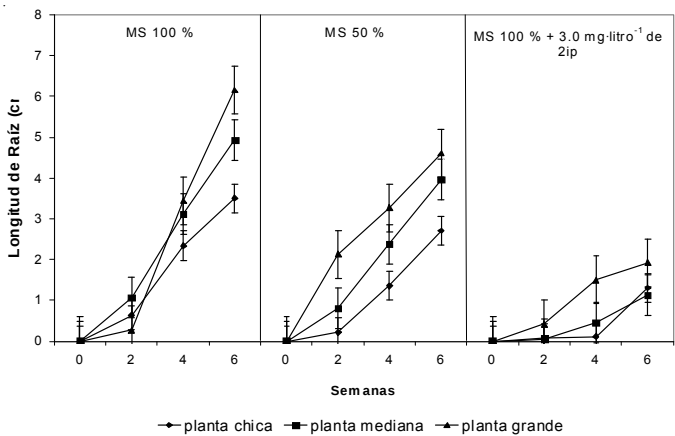


FIGURA 3. Longitud de raíz en un periodo de seis semanas para tres medios de cultivo con las sales MS y tres tamaños de planta en *A. inaequidens* Koch.

70 a 80 % y Robert *et al.* (1987) en *A. fourcroides* Lem. encontraron una sobrevivencia del 95 %. Lo anterior sugiere que los agaves en general no presentan mayor problema para transferirse a sustrato e invernadero. En el experimento se observó que la sobrevivencia de plantas de tamaño superior a 4 cm y con más de dos raíces fue del 100 %. Por otra parte, las plantas con hojas alargadas y delgadas después de la transferencia a sustrato formaron con el tiempo hojas normales. Definir el tamaño de planta y cantidad de raíz que favorecen la sobrevivencia de las plantas *A. inaequidens* Koch, permite determinar el tiempo que éstas deben permanecer en incubación en las diferentes etapas del cultivo *in vitro* y reducir costos y tiempo si se realiza una producción comercial.

CONCLUSIONES

Se logró propagar *in vitro* la especie *A. inaequidens* Koch, para ello se obtuvieron brotes de secciones de tallo y

CUADRO 5. Porcentaje de sobrevivencia de plantas de tres tamaños y dos cantidades de raíz de *A. inaequidens* Koch seis semanas después de la transferencia a sustrato e invernadero.

Tamaño de planta	Cantidad de Raíz	Sobrevivencia (%)
Chica ^z	Poca ^y	70
	Mucha	100
Mediana	Poca	100
	Mucha	100
Grande	Poca	100
	Mucha	100

^zchica (2.5 cm); mediana (4.0 cm) y grande (6.4 cm).
^ypoca (2 - 5 raíces) y mucha (7 - 9 raíces).

yemas axilares, las secciones de tallo formaron hasta 72 brotes. También se promovió el desarrollo de plantas utilizando diferentes concentraciones de BA, la concentración de 3.0 mg·litro⁻¹ incrementó la altura de brotes y la formación de nuevas hojas. Los reguladores BA, Kin y 2ip en las concentraciones de 3 y 10 mg·litro⁻¹ generaron gran variedad de respuestas que van, desde una mayor altura de planta, más hojas y brotes, hasta la presencia de estructuras globulares y raíz. Así mismo, se encontró que el tamaño de planta y el medio de cultivo afectan el enraizamiento de las plantas. Por último, las plantas de longitud mayor a 4.0 cm con más de dos raíces presentaron una sobrevivencia del 100 %.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por financiar los estudios de postgrado de Fabiola Aureoles Rodríguez, primera autora; al Sr. Gustavo Fragoso Cibrián de la comunidad de Santiago de Pinos municipio de San Sebastián del Oeste Jalisco, por otorgar el material vegetal y a la Biol. Lilian López Chávez por contribuir en la identificación de la especie.

LITERATURACITADA

ANÓNIMO. 2003. La raicilla se niega a perder su imagen cerril. CientoUno 576: 7-8.

BINH, L. T.; MUOI, L. T.; OANH, H. T. K.; THANG, T. D.; PHONG, D. T. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 23: 67-70.

DAS, T. 1992. Micropropagation de *Agave sisalana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 253-255.

ENRÍQUEZ, V. J. R.; CARRILLO, C. G.; RODRÍGUEZ DE LA O, J. L. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. Revista Fitotecnia Mexicana 28: 175-179.

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

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

- JANKIEWICZ, L. S. 2003. Reguladores de crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Propiedades y acción. Ed. Mundi-Prensa. México, D. F. 487 p.
- KENDE, H. ; ZEEVAART, D. J. A. 1997. The five "classical" plant hormones. *Plant Cell* 9: 1197-1210.
- MADRIGAL, S. X.; DÍAZ, B. O. 1991. Un caso teratológico de fasciación en *A. inaequidens* C. Koch (Amaryllidaceae) en la cuenca de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Acta Botánica Mexicana* 15: 65-70.
- MELDAB, G.; RUÍZ, M. L. 2004. Comparación del crecimiento de magueyes pulqueros (*Agave salmiana* Otto ex. Salm y *Agave mapisaga* Trel.) bajo esquemas de propagación *in vitro* y condiciones de invernadero. *Biología Scripta Maqueda* 1: 1-6.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- POWERS, E. D.; BACKHAUS, R. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry and Weber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16: 57-60.
- ROBERT, M. L.; HERRERA, J. L.; CONTRERAS, F.; SCORER, K. L. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequén). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 8: 37-48
- RODRÍGUEZ G., B.; ACOSTA, D., B. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture*. 46: 85-87.
- SALISBURY, B. F.; ROSS, W.C. 1994. Fisiología vegetal. Ed. Iberoamericana. México. 759 p.
- SANTACRUZ R., F.; GUTIÉRREZ, H.; RODRÍGUEZ, B. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 163-167.
- UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. 2004. Curso de introducción a la programación SAS[®] V8. Servicios informáticos de apoyo a docencia e investigación. Apoyo a investigación. España. 74 p.
- WETMORE, R. H.; SOROKIN, S. 1955. On the differentiation of xylem. *Journal of the Arnold Arboretum* 36: 305-317.