



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

POTENCIAL OSMÓTICO Y ABSORCIÓN NUTRIMENTAL EN EL
CULTIVO *in vitro* DE *Agave potatorum* Zucc.

ANA LUISA SOLANO AGAMA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2011

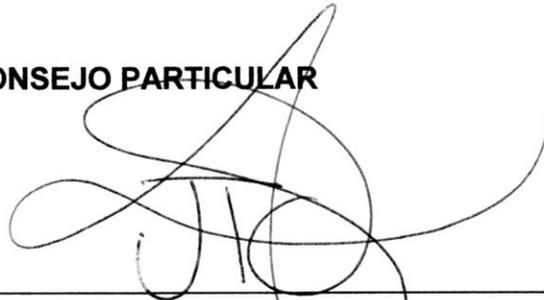
La presente tesis titulada: **“POTENCIAL OSMÓTICO Y ABSORCIÓN NUTRIMENTAL EN EL CULTIVO *in vitro* DE *Agave potatorum* Zucc.”**, realizada por la alumna: Ana Luisa Solano Agama bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. PROMETEO SÁNCHEZ GARCÍA

ASESOR:



DR. JOSÉ RAYMUNDO ENRÍQUEZ DEL VALLE

ASESORA:



DRA. CECILIA BEATRIZ PEÑA VALDIVIA

Montecillo, Texcoco, Edo. de México, Abril de 2011

POTENCIAL OSMÓTICO Y ABSORCIÓN NUTRIMENTAL EN EL CULTIVO *in vitro* DE *Agave potatorum* Zucc.

Ana Luisa Solano Agama, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2011

RESUMEN

Con el objeto de conocer el efecto del potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio de Murashige y Skoog se determinó el contenido de humedad, peso de materia seca, concentración y extracción nutrimental en brotes de *Agave potatorum* Zucc. Se establecieron medios de cultivo con los siguientes potenciales osmóticos: -0.187, -0.139, -0.094 y -0.050 MPa. El experimento se estableció con un diseño completamente al azar con cuarenta y cinco repeticiones. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$). Después de 90 días del establecimiento del experimento se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos para las variables evaluadas. El medio de cultivo con potencial osmótico de -0.187 MPa presentó los mayores valores para contenido de humedad (93.74%), peso de materia seca (350.4 mg explante⁻¹), concentración de N (2.97%), P (0.21%), K (5.41%), Ca (0.40%), Mg (0.21%), Fe (244.03 ppm), Zn (107.66 ppm) y Mn (152.79 ppm), además de la extracción de N (9.5 mg explante⁻¹), P (0.7 mg explante⁻¹), K (18.4 mg explante⁻¹), Ca (1.4 mg explante⁻¹), Mg (0.7 mg explante⁻¹), Fe (81.22 µg explante⁻¹), Cu (7.51 µg explante⁻¹), Zn (36.88 µg explante⁻¹) y Mn (53.59 µg explante⁻¹).

Palabras clave: *Agave potatorum* Zucc., potencial osmótico, medio MS, absorción y extracción nutrimental.

OSMOTIC POTENTIAL AND NUTRIENT ABSORPTION IN THE *in vitro* CULTURE OF *Agave potatorum* Zucc.

Ana Luisa Solano Agama. M.C.
Colegio de Postgraduados, 2011

ABSTRACT

With the object to determine the effect of osmotic potential of inorganic salts of Murashige and Skoog was determined moisture content, dry matter, nutrient concentration and extraction in shoots of *Agave potatorum* Zucc. Culture media were established with the following osmotic potentials: -0.187, -0.139, -0.094 and -0.050 MPa. The experiment was established with a completely randomized design with forty-five repetitions. The data were subjected to an analysis of variance and mean (Tukey, $\alpha=0.05$). After 90 days of the establishment of the experiment were statistically significant differences between treatments for the variables. The culture medium osmotic potential of -0.187 MPa showed the highest values for moisture content (93.74%), dry matter weight (350.4 mg explant⁻¹), concentration of N (2.97%), P (0.21%) K (5.41%), Ca (0.40%), Mg (0.21%), Fe (244.03 ppm), Zn (107.66 ppm) and Mn (152.79 ppm), as well as the extraction of N (9.5 μg explant⁻¹), P (0.7 μg explant⁻¹), K (18.4 μg explant⁻¹), Ca (1.4 μg explant⁻¹), Mg (0.7 μg explant⁻¹), Fe (81.22 μg explant⁻¹), Cu (7.51 μg explant⁻¹), Zn (36.88 μg explant⁻¹) and Mn (53.59 μg explant⁻¹).

Keywords: *Agave potatorum* Zucc., osmotic potential, MS's medium, nutrient absorption and extraction.

DEDICATORIA

A Dios

por permitirme alcanzar un objetivo más.

A mi Madre

Francisca Agama Bautista, sé que siempre estarás a mi lado dándome fortaleza.

A mis hijos

Nicole Elisa y André Gael, por iluminar mi vida y motivarme a superarme tanto en lo personal como en lo profesional. Gracias por todo el amor que me dan día a día, los amo.

A mi esposo

Abel Santillán Ángeles por tu apoyo incondicional, confianza y paciencia.

A mis hermanos

Ma. del Carmen, Irma, Graciela y Juan Pablo han sido parte fundamental en este proceso, les agradezco su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo otorgado.

A los integrantes de mi Consejo Particular:

Dr. Prometeo Sánchez García
Dr. José Raymundo Enríquez del Valle
Dra. Cecilia B. Peña Valdivia

por guiarme en este trabajo de investigación. Gracias a cada uno de ellos, por sus valiosas aportaciones, dedicación, sugerencias y paciencia.

A todos los profesores que contribuyeron en mi formación profesional: Dr. P. Sánchez García, Dr. A. Trinidad Santos, Dra. L.I. Trejo Téllez, Dr. F.C. Gómez Merino, Dra. M.N. Rodríguez Mendoza, Dr. H. González Rosas, Dr. J. Tovar Salinas, Dr. J.L. Tirado Torres y Dr. H. Vaquera Huerta.

A la Dra. Ana María Castillo González (Depto. de Fitotecnia), Dr. Joel Pineda Pineda (Depto. de Suelos) e Ing. Abel Santillán Ángeles por el apoyo brindado en el análisis vegetal.

A la Sra. Nelva Lubia Méndez A. (Laboratorio de Biotecnología, ITAO), Laurita Santamaría, Lorena Díaz A. y Lupita (Área de Nutrición Vegetal, COLPOS) y al personal de la biblioteca en especial al Sr. Juan y Sr. Felipe por su amistad, amable atención y calidez humana.

A las Familias Barroso Bravo, Hernández Barroso y Barroso Agama por su amable atención durante mi estancia en Oaxaca.

A Lilia Salgado Meraz, Concepción López Navarrete, Dulce María Schott Martínez, Leopoldo Arroyo Vargas, Celia Estrada Nolasco e Ibar Santamaría Tlatilpa gracias amigos por compartir grandes momentos y contar con su amistad, lo más valioso.

ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	<i>iii</i>
ABSTRACT	<i>iv</i>
DEDICATORIA	<i>v</i>
AGRADECIMIENTOS	<i>vi</i>
ÍNDICE GENERAL	<i>vii</i>
ÍNDICE DE CUADROS	<i>x</i>
ÍNDICE DE FIGURAS	<i>xi</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Generalidades de <i>Agave potatorum</i> Zucc.	3
2.1.1 Origen y distribución	3
2.1.2 Descripción botánica y morfológica	4
2.1.3 Metabolismo	5
2.1.4 Métodos de propagación	9
2.1.4.1 Propagación por semilla	9
2.1.4.2 Cultivo de tejidos	12
2.1.5 Importancia económica	15
2.2 Propagación <i>in vitro</i>	18
2.2.1 Medio de cultivo	19
2.2.1.1 Sales inorgánicas	19
2.2.1.2 Compuestos orgánicos	21
2.2.1.3 Complejos naturales	21
2.2.1.4 Materiales inertes de soporte	22
2.3 Nutrición vegetal	22
2.3.1 Absorción nutrimental	24
2.3.2 Extracción nutrimental	26
2.4 Potencial osmótico	26
III. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos particulares	28
IV. HIPÓTESIS	
4.1 Hipótesis general	29
4.2 Hipótesis particulares	29
V. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Ubicación del experimento	30
5.2 Material vegetal	30
5.3 Medio de cultivo	30
5.4 Establecimiento del cultivo	32
5.5 Condiciones de incubación	32
5.6 Tratamientos y diseño experimental	32

5.7	Parámetros evaluados	
5.7.1	Materia fresca y seca	33
5.7.2	Concentración nutrimental	33
5.7.3	Extracción nutrimental	34
5.8	Análisis estadístico	34
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1	Potencial osmótico generado por las sales inorgánicas del medio de cultivo Murashige-Skoog	35
6.2	Efecto del potencial osmótico del medio de cultivo MS en brotes de <i>A. potatorum</i> Zucc.	36
6.2.1	Porcentaje de humedad y producción de materia seca	36
6.2.2	Concentración de N, P y K en brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc. cultivados <i>in vitro</i>	39
6.2.2.1	Nitrógeno	40
6.2.2.2	Fósforo	42
6.2.2.3	Potasio	44
6.2.3	Concentración de Ca y Mg en brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc. cultivados <i>in vitro</i>	45
6.2.3.1	Calcio	46
6.2.3.2	Magnesio	48
6.2.4	Concentración de micronutrientos (Fe, Cu, Zn y Mn) en brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc. cultivados <i>in vitro</i>	51
6.2.4.1	Hierro	52
6.2.4.2	Cobre	53
6.2.4.3	Zinc	53
6.2.4.4	Manganeso	54
6.2.5	Extracción nutrimental en brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc. en dependencia del potencial osmótico del medio de cultivo	56
6.3	Correlaciones entre variables	60
VII.	CONCLUSIONES	64
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Composición de fructosa y glucosa en la miel de especies de <i>Agave</i> utilizadas en la elaboración de bebidas alcohólicas.	17
Cuadro 2.	Sales inorgánicas empleadas en la preparación de soluciones madre para obtener medio Murashige y Skoog.	31
Cuadro 3.	Alícuotas de la solución madre para la preparación del medio Murashige y Skoog con concentraciones variables.	31
Cuadro 4.	Tratamientos, concentración, conductividad eléctrica y potencial osmótico (PO) del medio de cultivo Murashige-Skoog.	35
Cuadro 5.	Porcentaje de humedad (%H ₂ O) y peso de materia seca (PMS) en brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc. cultivados <i>in vitro</i> en el medio de cultivo Murashige-Skoog, con potencial osmótico diferente.	36
Cuadro 6.	Concentración (%) de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) en brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc. cultivados <i>in vitro</i> en dependencia del potencial osmótico (PO) del medio de cultivo Murashige-Skoog.	40
Cuadro 7.	Concentración (%) de calcio (Ca) y magnesio (Mg) en brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc. cultivados <i>in vitro</i> respecto al potencial osmótico del medio de cultivo Murashige-Skoog	46
Cuadro 8.	Concentración de micronutrientes (Fe, Cu, Zn y Mn) en brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc. <i>in vitro</i> en dependencia del potencial osmótico del medio de cultivo Murashige-Skoog.	52
Cuadro 9.	Efecto del potencial osmótico del medio (Murashige-Skoog) en la extracción nutrimental de brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc. cultivados <i>in vitro</i> .	57
Cuadro 10.	Coefficientes de correlación de Pearson entre los elementos representantes en la absorción nutrimental en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Agave potatorum</i> Zucc.	61
Cuadro 11.	Coefficientes de correlación de Pearson entre la extracción nutrimental por brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc. cultivados <i>in vitro</i> , en medio con diferente potencial osmótico (PO).	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Oscilaciones del pH, la acidez debida a ácidos orgánicos y la concentración de almidón en plantas CAM, durante un periodo de 48 horas.	6
Figura 2.	Resumen en el proceso de la fijación de CO ₂ durante el día y la noche en plantas CAM.	7
Figura 3.	Material vegetal empleado en la propagación <i>in vitro</i> de <i>Agave potatorum</i> Zucc., en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. a) brotes adventicios múltiples, b) separación del brote mayor al que se eliminaron las hojas, c) partición del tallo en dos mitades longitudinales, para establecerlas en un medio de cultivo para continuar la proliferación de propágulos.	14
Figura 4.	Estados que poseen la denominación de origen del mezcal.	16
Figura 5.	Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y el %H ₂ O en <i>Agave potatorum</i> Zucc.	37
Figura 6.	Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y peso de materia seca en <i>Agave potatorum</i> Zucc.	39
Figura 7.	Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y el % de nitrógeno en <i>Agave potatorum</i> Zucc.	41
Figura 8.	Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y el % de fósforo en <i>Agave potatorum</i> Zucc.	43
Figura 9.	Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y el % de potasio en <i>Agave potatorum</i> Zucc.	45
Figura 10.	Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y el % de calcio en <i>Agave potatorum</i> Zucc.	48
Figura 11.	Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y el % de magnesio en <i>Agave potatorum</i> Zucc.	49
Figura 12.	Efecto del potencial osmótico del medio de cultivo Murashige y Skoog en el contenido de N, P, K, Ca y Mg en brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc. cultivados <i>in vitro</i> .	51
Figura 13.	Efecto del potencial osmótico del medio de cultivo Murashige y Skoog en el contenido de Fe, Cu, Zn y Mn, en brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc. cultivados <i>in vitro</i> .	56
Figura 14.	Extracción de N, P, K, Ca y Mg por brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc cultivados <i>in vitro</i> en diferentes potenciales osmóticos del medio de cultivo Murashige-Skoog.	58
Figura 15.	Extracción de Fe, Cu, Zn y Mn por brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc. cultivados <i>in vitro</i> en dependencia del potencial osmótico del medio de cultivo Murashige-Skoog.	60

I. INTRODUCCIÓN

De un total de 166 especies vegetales que se incluyen en el género *Agave* a nivel mundial, 125 son nativas de México (García-Mendoza, 2004), por ello, se considera a nuestro país como centro de origen de este género (Granados, 1993). En el Estado de Oaxaca se encuentran 58 especies, plantas de larga vida que han acompañado a las culturas oaxaqueñas y mesoamericanas desde hace más de 9 000 años (Gentry, 1982), que han sido aprovechados de manera integral, entre los cuales, destaca la elaboración de bebidas alcohólicas de alto grado, utilizando para ello una importante riqueza genética de agaves, representada por varias especies, variedades y formas que se recolectaban para este fin (Sánchez, 1989). Actualmente esta diversidad está siendo amenazada, especialmente para *Agave potatorum* Zucc, conocido también como tobalá o papalométl (del náhuatl que significa agave mariposa), ya que plantas adultas se colectan, no permitiendo el desarrollo del tallo floral y por consiguiente evitando la producción de semillas, vitales para su propagación (Enríquez, 2008). La micropropagación o cultivo *in vitro* es una herramienta útil y tiene por objetivo lograr la multiplicación de nuevas plantas a partir de explantes, en un medio artificial, en condiciones asépticas, utilizando un mínimo espacio durante todo el año (Hartmann y Kester, 1994). Esta herramienta ha sido útil en la propagación *in vitro* de algunas especies del género *Agave*, algunos trabajos, principalmente en la fase de propagación, se han enfocado a especies de importancia económica como las productoras de fibra: Robert *et al.*, 1987 (*A. fourcroydes*), Binh *et al.*, 1990 (*A. sisalana*, *A. cantala* y *A. fourcroydes*), Hazra *et al.*, 2000 (*A. sisalana*); elaboración de bebidas alcohólicas: Enríquez *et al.*, 2005 (*A. angustifolia*), Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006 (*A. tequilana*), Silos-Espino *et al.*, 2007 (*A. salmiana*) y Domínguez *et al.*, 2008 (*A. potatorum*, *A. cupreata*, *A. karwinskii*), y especies ornamentales: Santacruz-Rubalcava *et al.*, 1999 (*A. parrasana*), Martínez-Palacios *et al.*, 2003 (*A. viactoriae-reginae*) y Domínguez *et al.*, 2008 (*A. obscura* y *A. difformis*). En la mayoría de éstos, han empleado el medio basal Murashige y Skoog (1962) y variando los tratamientos de compuestos orgánicos (hormonas de crecimiento y vitaminas), y pocos se han enfocado en el efecto de los carbohidratos (tipo y cantidad), variación en las sales inorgánicas y en el material inerte de soporte (cantidad y tipo). La composición

mineral y la fuente de carbono (azúcares), influyen directamente en el potencial osmótico del medio de cultivo y éste a su vez repercute en el desarrollo de los explantes (George, 1993). La importancia de conocer el potencial osmótico del medio del cultivo evita algunas alteraciones fisiológicas en la propagación *in vitro*, Pierik, (1990). En la mayoría de las investigaciones realizadas, pocos enfatizan en el efecto que tiene éste en el crecimiento y distribución de nutrimentos en las plantas cultivadas *in vitro* (Molinos *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del potencial osmótico del medio basal Murashige y Skoog (1962) en diferentes concentraciones nutrimentales, en el contenido de humedad, producción de biomasa, absorción y extracción nutrimental en brotes de *Agave potatorum* Zucc. en condiciones *in vitro*. Además de conocer las interacciones nutrimentales en la absorción y extracción por medio de los coeficientes de correlación de Pearson.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del cultivo de *A. potatorum* Zucc.

2.1.1 Origen y distribución

Los magueyes silvestres son endémicos del Continente Americano, estas plantas perennes, se han usado de diversas formas (obtención de fibras, como material de construcción, entre otros) y han formado parte de la alimentación de los humanos en la Cultura Mesoamericana desde hace más de 9 000 años (Gentry, 1982).

México es el centro de origen del género *Agave*, donde se encuentra cerca del 75% del total de especies descritas en el mundo y el país con mayor diversidad de magueyes (García-Mendoza y Galván, 1995).

García-Mendoza (2004) menciona que en el Estado de Oaxaca se encuentran 58 especies de este género, de las cuales 13 son endémicas. El género *Agave* constituye uno de los grupos de plantas más importantes desde el punto de vista cultural y económico. Su presencia en casi todo el estado, la amplitud ecológica en la que se desarrolla y la diversidad de formas, permiten el aprovechamiento de muchas de las especies que integran el género *Agave* y de todas las estructuras morfológicas de la planta. Una de estas especies es *A. potatorum* Zucc, conocido también como tobalá o papalométl (del náhuatl que significa agave mariposa) y se distribuye en 20 distritos: Centro, Coixtlahuaca, Cuicatlán, Etlá, Huajuapán, Ixtlán, Juxtahuaca, Miahuatlán, Mixe, Nochixtlán, Pochutla, Sola de Vega, Tehuantepec, Teotlitán, Teposcolula, Tlaxiaco, Villa Alta, Yautepec, Zaachila y Zimatlán. Se desarrolla en lugares soleados, sobre suelos calizos, en algunas comunidades vegetales como la selva baja caducifolia, matorral xerófilo y bosques templados de *Pinus* y *Pinus-Quercus*, en una altitud comprendida entre los 600 y 2400 m.s.n.m.

La disminución drástica de poblaciones silvestres de *A. potatorum* en las zonas de Sola de Vega y la Mixteca se debe principalmente a que la planta no produce hijuelos de rizoma; es decir, su propagación es por medio de semillas. La planta produce flores y semillas una sola vez en su vida después de lo cual muere. Los campesinos colectan las plantas adultas antes de que ocurra el desarrollo de la inflorescencia, llamado escapo floral y por consiguiente evitando la producción de semillas (Enríquez, 2008).

2.1.2 Descripción botánica y morfológica

Carlos Linneo fue el primero que describió taxonómicamente al género *Agave* que significa noble (del griego *agaue*), éste es el más importante de la familia Agavaceae con 136 especies (Nobel, 1998)

Agave potatorum o tobalá tiene la siguiente descripción taxonómica (Gentry, 1982):

Reino	<i>Plantae</i>
División	Angiospermae
Clase	Monocotyledoneae
Orden	Liliales
Familia	Agaveceae
Subfamilia	Agavoideae
Género	<i>Agave</i>
Sección	Rigidae
Especie	<i>Potatorum</i>

Agave potatorum son plantas monocotiledóneas, polimórficas, la altura media de la planta adulta es 0.54 m (del nivel del suelo al cono central de hojas), tienen más de 60 hojas avadas dispuestas en una roseta pequeña compacta (diámetro aproximado de 0.78m), lanceoladas, suculentas, de color verde a verde-glaucas, son angostas con una longitud promedio de 34 cm (medida de la base al extremo apical), anchura de 13.1cm (región media), con margen crenado con prominencias mamiladas sobre

las que se acomodan los dientes, tienen una espina terminal de 3 a 5 cm de longitud, la espina es gruesa y de color castaño, gris o café. Los tallos de las plantas maduras son apreciados porque son usados en la elaboración de mezcal, sobre todo en los Valles Centrales de Oaxaca, presentan un intervalo amplio de peso entre 35 y 121 kg. La inflorescencia de esta especie desarrolla un eje floral de aproximadamente de 3 a 6 m de altura, es racimosa con paquetes de flores subsésiles o paniculada, con pedúnculos laterales; el escapo con brácteas conspicuas con colores rojo a púrpura, con 15 a 30 paquetes de flores en la parte media a la cuarta parte del escapo, flores polimórficas, en umbelas compactas y pequeñas de un verde claro a amarillo, frecuentemente teñidas de púrpura sobre las espinas o puntas; tépalos y filamentos de 55 a 80 mm de longitud, gruesos y succulentos; ovario de 25 a 50 mm de largo, generalmente grueso con un nectario corto azucarado; pistilo cilíndrico de 10 a 17 mm con pared gruesa; cápsulas largas (4 a 5.5 cm) y 2 cm de anchura, ovoides, susésiles o estipadas y cortas; semillas de 6 a 7 de longitud y 5 a 6 mm de anchura, lacrimiformes, negras o brillantes y borde escasamente alado (Gentry, 1982; Espinosa *et al.*, 2002, García-Mendoza, 2004).

2.1.3 Metabolismo

La mayoría de las plantas fijan el bióxido de carbono (CO₂) durante la fotosíntesis en presencia de luz solar; en estas condiciones los estomas se encuentran abiertos y presentan grandes pérdidas de humedad. Algunas plantas que evolucionaron en condiciones de poca humedad modificaron su metabolismo con la finalidad de ahorrar agua; así, para tomar CO₂ los estomas sólo se abren durante la oscuridad y permanecen cerrados durante el día. Este metabolismo se describió primeramente en las plantas de la Familia Crassulácea por lo que se le denominó Metabolismo Ácido Crasuláceo o plantas CAM. Los agaves realizan este tipo de metabolismo, guardando el CO₂ fijado en la oscuridad, este proceso ha facilitado su adaptación a la sequía de la zona ecológica más extensa del país: árida y semiárida con 84 millones de hectáreas, lo que representa el 45.3% del territorio nacional (Nobel, 1998; Granados, 1993).

Gil (1995), menciona que las características básicas de las plantas CAM son las siguientes:

- a) Captura neta sustancial de CO_2 atmosférico en la oscuridad y depresión o anulación de la captura neta de bióxido de carbono durante el día.
- b) Fluctuación diaria de la concentración de ácidos orgánicos, particularmente de ácido málico libre, en los tejidos fotosintéticos, con acumulación durante la noche y ausencia durante el día. También se encuentran presentes los ácidos aspártico, isocítrico, cítrico, tartárico y otros más que no sufren oscilaciones correlacionables con las de acidez total. Las fluctuaciones diarias de ácido málico son del orden de 100 a 200 $\mu\text{g g}^{-1}$, lo que puede determinar cambios de pH del orden de 2 unidades (de 5.5 a 3.5).
- c) Transformación estequiométrica de las reservas glucídicas en forma de poliglucanos (principalmente almidón) a málico durante la captura neta de CO_2 y síntesis de las mismas, también estequiométrica, a partir del ácido málico, durante el periodo de luz, por lo que se presenta una ritmicidad inversa de los glucanos de reserva respecto al acervo de malato.

Estos tres procesos se encuentran en coordinación causal unos con otros y se muestran en la Figura 1.

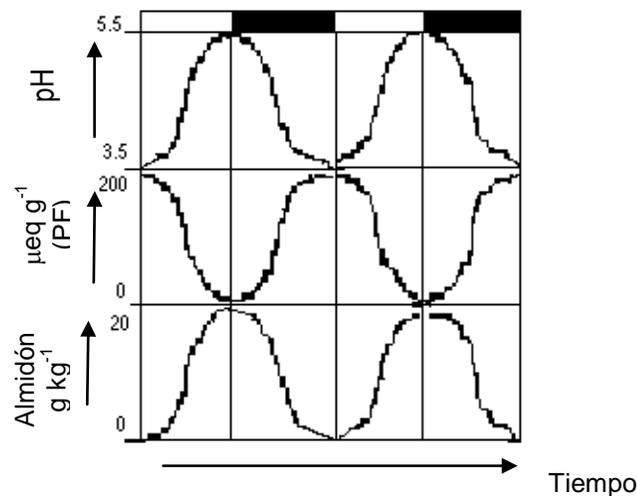


Figura 1. Oscilaciones del pH, la acidez debida a ácidos orgánicos y la concentración de almidón en plantas CAM, durante un periodo de 48 horas (Gil, 1995).

La Figura 2, muestra un modelo que describe con la fijación de CO₂ en plantas CAM. Durante la oscuridad, el almidón se degrada por glucólisis hasta PEP para formar oxalacetato, el cual se reduce a ácido málico por la acción de un malato deshidrogenasa dependiente del NADH. Los iones H⁺ provenientes del ácido málico son transportados a la gran vacuola central por una ATPasa y una bomba de pirofosfatasa, los iones malato como los H⁺, van al interior de la vacuola. Es aquí donde se acumula el ácido málico, hasta concentraciones que llegan a 0.3 M o mayores, hasta que amanece. Esta acumulación mantiene negativo al potencial osmótico de las células, de tal manera pueden absorber agua y almacenarla cuando la planta se encuentra en un medio salino o con humedad limitada.

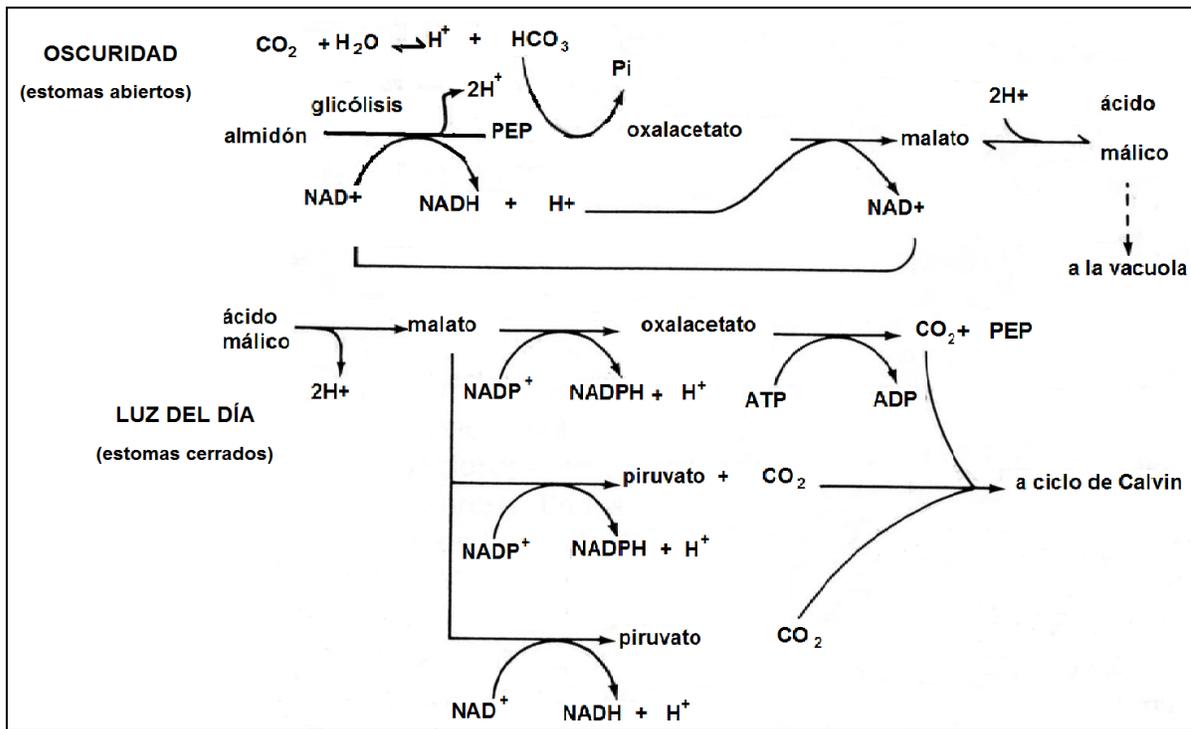


Figura 2. Resumen en el proceso de la fijación de CO₂ durante el día y la noche en plantas CAM, (Salisbury y Ross, 1994).

Durante el día, con la luz el ácido málico se difunde pasivamente hacia afuera de la vacuola y se descarboxila mediante uno o más de los tres mecanismos ilustrados en la Figura 2. El mecanismo utilizado depende en gran parte de la especie. El CO₂ que se libera se concentra en las células y es fijado nuevamente (sin fotorrespiración) por

la rubisco en el 3-PGA del ciclo de Calvin, lo que conduce a la formación de sacarosa, almidón y otros productos fotosintéticos. El piruvato que se forma por descarboxilación se convierte en PEP por acción de la piruvato fosfato dicinasa, después una parte del PEP es utilizado en la respiración y la otra parte se convierte en azúcares y almidón por glucólisis inversa, y en parte se transforma en aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y compuestos aromáticos (Salisbury y Ross, 1994).

En las plantas CAM ambos procesos se realizan en las mismas células, un proceso en la noche y el otro con la luz del día, mientras que la gran vacuola central almacena el ácido málico, que pudiera ser la causa de la disminución del valor del pH en el citosol por la noche. La permeabilidad baja al H⁺ del tonoplasto, que resulta de la ionización del ácido málico en la vacuola, debe tener especial importancia en las plantas CAM, ya que en la noche el pH de la vacuola muchas veces alcanza valores bajos (pH=4) (Salisbury y Ross, 1994; Lambers *et al.*, 1998).

Generalmente, se acepta que el CAM es una ruta alternativa de la fijación fotosintética del CO₂, pero existe cada vez más la tendencia a considerarlo como una adaptación bioquímica y fisiológica del metabolismo a los niveles bajos de CO₂ que, secundariamente, puede seleccionarse mediante su eficaz acción en la economía hídrica.

El estudio citológico de las células fotosintéticas de estas especies demuestra en ellas la presencia de grandes vacuolas almacenadoras de agua y ácidos orgánicos, es decir, las células fotosintéticas típicas de las plantas CAM son grandes y dejan enormes espacios intercelulares entre sí, poseen paredes delgadas, citosol parietal muy adosado a la membrana y una gran vacuola central que ocupa la mayor parte del volumen celular, por lo que parecen transparentes, tanto al microscopio óptico como el electrónico (Gil, 1995)

2.1.4 Métodos de propagación

Agave potatorum es una especie silvestre utilizada en la producción de mezcal (de origen náhuatl: metl=agave y calli=cocido) en las regiones donde se distribuye; su utilización en esta industria implica la extracción constante de plantas adultas y dado que se trata de plantas monocárpicas, la supresión de la floración y producción de polen y semillas, puede afectar los niveles de variación genética y estructuración de las poblaciones naturales, arriesgando su conservación a largo plazo. La producción de mezcal a partir de poblaciones silvestres es indispensable para evitar la adopción de prácticas de monocultivo y propagación que deterioran genéticamente las especies, pero ante el aumento de la demanda del mezcal es necesario incluir datos genéticos en los planes de manejo para no alterar la composición de las poblaciones y sus procesos evolutivos naturales (Aguirre, 2004).

Debido a la aceptación en el mercado y precio de venta del mezcal tobalá, los productores de este tipo de bebida encuentran incentivos para elaborar mayor volumen de la misma, por lo que la extracción de plantas adultas silvestres del maguey tobalá, ocurre de manera excesiva sin planes de manejo que aseguren la sustentabilidad del recurso de interés (Valenzuela y Sánchez, 1985).

2.1.4.1 Propagación por semilla

Los agaves: tobalá (*A. potatorum*), jabalí (*A. comvallis*), chato (*A. seemaniana* Jacobi) y papalote o ancho (*A. cupreata* Trel.) no producen hijuelos provenientes del rizoma, la propagación se realiza mediante semillas (Enríquez, 2008).

La reproducción sexual se considera como una forma de producir variabilidad, además que permite la evolución de la especie. Esta característica importante la presentan los magueyes propagados por semilla (Cruz *et al.*, 1985).

Gentry (1982), Granados (1993) y Sumano (2005) mencionan que una vez transcurrido el tiempo durante el cual la producción de savia ha pasado de las hojas al tallo (de 8 a 10 años), se inicia la formación del tallo floral en la parte central de la planta de maguey, empieza a ser visible a finales del mes de agosto (el desarrollo del tallo floral tarda aproximadamente 55 días), y las primeras flores aparecen durante el mes de octubre. La polinización de las inflorescencias se lleva a cabo por insectos, pero principalmente colibríes. La estación de floración finaliza en el mes de diciembre. La maduración de las cápsulas se realiza en dos fases, la primera se inicia a mediados de enero, cuando las cápsulas ubicadas en la zona alta de la inflorescencia alcanzan un tono amarillento. La segunda cuando las cápsulas ubicadas en la zona baja de la misma, muestran un color café claro. Este proceso finaliza durante los primeros días de febrero, después de este periodo las cápsulas abren, originando la diseminación de las semillas, las que germinan con las primeras lluvias.

Sumano (2005), recomienda recolectar las semillas provenientes de los magueyes de mayor tamaño y hace una descripción detallada en la producción de plántulas de *A. potatorum*, esta actividad también la realizan otros productores en Sola de Vega, Oaxaca, para el establecimiento de plantaciones comerciales. Tomando en cuenta las etapas fenológicas mencionadas anteriormente el proceso se inicia con:

1. Recolección de cápsulas y extracción de semillas. Esta actividad inicia con la recolección de las cápsulas, se colocan en un lugar soleado durante 10 días, sin ráfagas de viento. Cuando las cápsulas toman un color café y abren sus carpelos, han alcanzado su madurez fisiológica. La semilla se recolecta de las cápsulas abiertas y cerradas.
2. Obtención de la semilla viable. Las semillas se someten a un proceso de limpieza, son separadas las semillas vanas e impurezas por medio de una malla de 5 x 5 mm. La viabilidad de estas semillas puede alcanzar un 80%.
3. Preparación del almácigo. Consiste en levantar camas de 36 m² (30.0m de largo x 1.20m de ancho) y 0.30m de alto, bien nivelado con un pequeño bordo,

para evitar el escurrimiento del agua y arrastre de semillas, agregar materia orgánica totalmente sin terrones grandes ni piedras. En la orilla se colocan estacas en forma de “Y” de 60 cm de largo, cada dos metros. La estaca enterrada deberá tener una altura de 30 cm.

4. Siembra de la semilla. Esta actividad se realiza en la última semana de marzo. En los 36 m² de la cama es posible establecer 1 kg de semilla viable, distribuida al voleo de manera uniforme, posteriormente se cubren con 0.5 cm de tierra mullida, con este proceso se pueden obtener 2500 plántulas por m².
5. Colocación de sombra. Se puede colocar una malla para sombra u otro material con el mismo fin y con ayuda de las estacas “Y” la sombra debe quedar a 25 o 30 cm de altura.
6. Riego del almácigo. Se realizan 2 diariamente (mañana y noche) durante los primeros 10 días y después cada tercer día hasta que inicia la emergencia, misma que ocurre a los 20 días después de la siembra.
7. Fertilización. Durante el crecimiento en el almácigo se recomienda aplicar fertilización foliar una vez al mes (no especifica la dosis ni fuente del fertilizante).
8. Eliminación de sombra. Cuando la mayoría de las plántulas terminan de emerger y en algunas empiezan a aparecer las primaras hojas lanceoladas, se inicia la eliminación de la sombra de forma gradual, para que las plántulas se adapten a las condiciones naturales de radiación sin sufrir estrés.
9. Preparación de camas de crecimiento. Las plántulas se trasplantan a una cama de crecimiento para evitar competencia entre ellas mismas. Las dimensiones son 1.20 de ancho y 0.30 m de altura, la longitud se adecúa a las condiciones de riego. Procurando dejar un pasillo de 0.60 m de ancho entre camas para facilitar las labores de manejo (deshierbe, fertilización, aplicaciones de plaguicidas u otras). Esta actividad se realiza a los cinco meses de la emergencia de las plántulas. En la cama de siembra se hacen agujeros con una distancia de 8 cm. Durante esta actividad se hace una selección de plántulas, eliminando las menos vigorosas y de menor tamaño.

10. Riegos. En el primer mes se realizan dos riegos por semana y posteriormente uno por semana, tomando en cuenta la temporada de lluvia.
11. Control de malezas. Se recomienda eliminarlas manualmente conforme van emergiendo.
12. Fertilización. Se realizan dos aplicaciones de 150 g de fosfato diamónico por m², la primera aplicación al mes del trasplante y la segunda cuatro meses después.
13. Control de plagas y enfermedades. Las plagas que atacan a las plántulas son gallina ciega y torito o picudo y se controlan aplicando Furadán® líquido (2 cm³ por litro de agua) dirigido a la base de la plántula. Esta aplicación tiene mayor efecto cuando existe mayor humedad en el suelo.
14. Cosecha de plántulas. Éstas están listas para el trasplante al terreno definitivo cuando tienen aproximadamente 20 cm de altura. La planta completa se extrae, enseguida se eliminan las hojas senescentes y se deja la raíz con 1 cm de largo. Las plantas se pueden sembrar inmediatamente o bien dejarlas marchitar durante 4 o 5 días antes de plantarla, esta práctica estimula el brote de raíces nuevas rápidamente.

2.1.4.2 Cultivo de tejidos

El cultivo de tejidos es útil y su éxito está relacionado, entre otros factores, con la composición mineral y orgánica del medio de cultivo para mantener el crecimiento de las plantas (Pierik, 1990).

Hartmann y Kester 1994, mencionan que la propagación clonal de plantas mediante esta técnica, se basa en el principio de que toda célula vegetal tiene la información genética para regenerar un organismo completo (totipotencia) y para que la célula pueda expresar este potencial es necesario que se le proporcione las condiciones ambientales adecuadas, empleando medios nutritivos de composición definida, en recipientes de material transparente (vidrio o polivinilo), así como condiciones

asépticas en las etapas de propagación. Los factores que influyen en la respuesta de los cultivos *in vitro* se agrupan en:

- a) Composición química del medio de cultivo. Sus componentes son agua, sales inorgánicas (macro y micronutrientes), compuestos orgánicos (carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento, complejos orgánicos y sustancias de soporte físico).
- b) Condiciones físicas de incubación. Entre ellas están la temperatura, iluminación, humedad relativa y gases atmosféricos.

Existen casos exitosos de producción de *in vitro* plantas, que han resuelto necesidades de industrias específicas como caña de azúcar, plátano y maguey. En el caso específico de *A. tequilana*, el tiempo que se requiere desde el inicio del cultivo hasta la cosecha (jima), se ha reducido sustancialmente cuando el cultivo es iniciado a partir de plantas micropropagadas (Torres *et al.*, 2006).

Existen algunos trabajos relacionados con la propagación *in vitro* de *A. potatorum*, en los cuales se ha usado como medio de cultivo al Murashige-Skoog (MS) formulado en 1962. A continuación se citan algunos.

En el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca (ITVO), se lleva a cabo la micropropagación de *A. potatorum*, para ello emplean el medio de cultivo MS, suplementado con 30g L⁻¹ de sacarosa, 0.1 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 100.0 mg L⁻¹ de mioinositol, 1.0 mg L⁻¹ de benciladenina y pH 5.7±0.1. Cabe mencionar que en la fase de propagación utilizan plántulas bien desarrolladas (Figura 3a), de las cuales se extrae el tallo de 1 cm de longitud (Figura 3b) y posteriormente son seccionadas longitudinalmente, obteniendo dos explantes por tallo para la proliferación de brotes (Figura 3c).



Figura 3. Material vegetal empleado en la propagación *in vitro* de *Agave potatorum* Zucc., en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. a) brotes adventicios múltiples, b) separación del brote mayor al que se eliminaron las hojas, c) partición del tallo en dos mitades longitudinales, para establecerlas en un medio de cultivo para continuar la proliferación de propágulos.

Martínez (2004), empleó como material vegetal *in vitro* plantas bien diferenciadas pertenecientes a la fase de multiplicación. Dicho material se multiplicó en medio MS, pero no detalla los requerimientos del establecimiento del cultivo *in vitro*. Cabe mencionar, que el material vegetal fue empleado para evaluar las condiciones de aclimatación y enraizamiento en condiciones *in vitro* e *in situ*. Los resultados obtenidos mostraron que el proceso de aclimatación *in situ* se llevó a cabo en 25 días, lo que generó una reducción de 15 días comparado con la aclimatación *in vitro*. La sobrevivencia de plantas en el proceso de aclimatación y enraizamiento *in situ* fue del 85%, producto de la combinación de 1500 ppm de AIB en agrolita (sustrato), las raíces formadas eran vigorosas y su longitud promedio era de 7.2 cm.

Domínguez *et al.* (2008) evaluaron el efecto de las citocininas en la propagación *in vitro* de cinco especies de *Agaves* mexicanos, uno de ellos *A. potatorum*. Usaron como explantes tejidos meristemáticos extraídos de plántulas germinadas *in vitro* en medio de cultivo MS adicionando con 30g L^{-1} de sacarosa, 8g L^{-1} de agar y a $\text{pH}=5.7$, en esta fase (45 días después) obtuvieron un 60% de germinación *in vitro* y plántulas de 3 a 6 cm. Estas fueron usadas en la siguiente fase como explantes para observar el efecto de las citocininas en la generación de brotes múltiples. Para ello usaron el medio de cultivo MS adicionado con 30g L^{-1} de sacarosa, 8g L^{-1} de agar,

pH ajustado a 5.7 y las citocininas evaluadas fueron 6-bencilaminopurina o benciladenina (BA), 6- γ,γ -dimetilalilaminopurina (2iP), cinetina (Cin), tidiazurón (TDZ) y [N⁶-(metahidroxibencil)adenina] o metatopolina (MT), cada una en las siguientes concentraciones: 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹. Después de 90 días de establecido el experimento concluyeron que la mejor respuesta se obtuvo con el tratamiento con 30 mg L⁻¹ de Cin generando el mayor número de brotes (promedio de 6.9 brotes explante⁻¹) para esta especie. De manera general sobre la evaluación del estudio completo, se concluyó que cada una de las cinco especies respondió diferente a las concentraciones de los reguladores de crecimiento suministrados *in vitro*.

Enríquez (2008) menciona que la Sociedad de Producción Rural “Biofábrica de Oaxaca”, desde el año 2004 propagan *A. potatorum in vitro*, pero no indica las condiciones en las que se lleva este proceso.

2.1.5 Importancia económica

Dependiendo de la región geográfica del país, cambia la especie de *Agave* que se usa para elaborar mezcal, bebida alcohólica que se procesa mediante cocimiento, molienda, fermentación y destilación (Valenzuela, 2007).

En los últimos años, el mercado internacional de bebidas alcohólicas ha sido invadido por un producto que no había tenido gran presencia en décadas: el mezcal. La aceptación del consumo de este producto en el mundo tomó gran peso a partir de la segunda mitad del siglo XX. Un factor importante que ha incidido en el incremento de la demanda del mezcal, sin duda, ha sido el aumento de turismo que viene a México y que prueba la bebida, la cual posteriormente es solicitada en su país de origen. Oaxaca se sitúa como el primer estado productor de esta bebida y como materia prima usa principalmente el agave espadín (*A. angustifolia*) y en menor medida el agave tobalá (*A. potatorum*). Este último generalmente lo cosechan de poblaciones silvestres para la elaboración del mezcal de forma artesanal, esta bebida es muy apreciada, ya que la consideran de excelentes características organolépticas,

cotizándose hasta en un 100% más que el mezcal obtenido de otras especies (Sánchez, 1989; Fundación Produce Oaxaca, 2005; Sumano, 2005).

La denominación de origen del mezcal la poseen los estados de Oaxaca, Guerrero, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Guanajuato y Tamaulipas (Figura 4). En el Estado de Oaxaca la región del mezcal comprende dos zonas: Sierra Sur (Yautepec, Miahuatlán y Sola de Vega) y Valles Centrales (Tlacolula, Ocotlán, Zimatlán y Ejutla), (Fundación Produce de Oaxaca, 2005; Valenzuela, 2007).

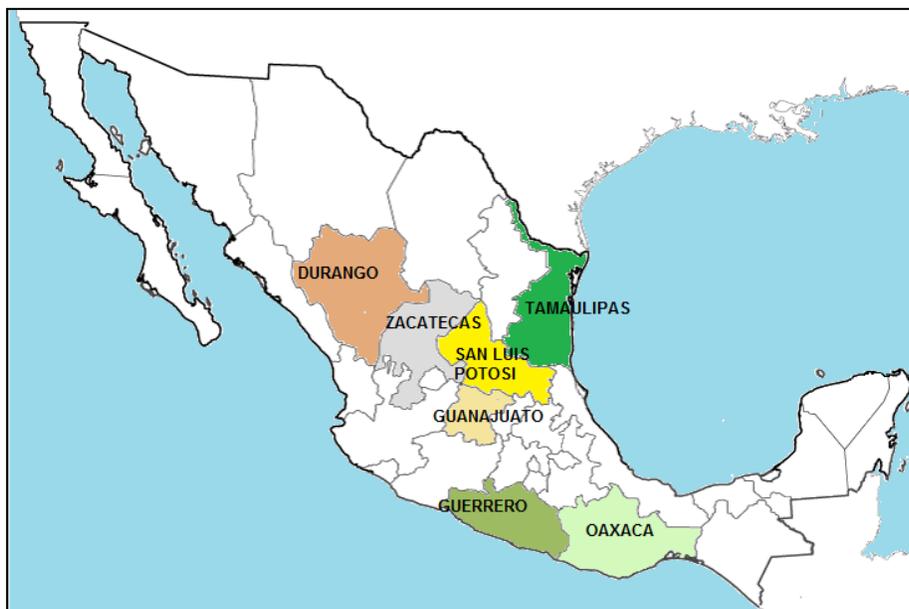


Figura 4. Estados que poseen la denominación de origen del mezcal.

Además de la producción de mezcal con especies de este género, también se obtiene la miel de agave, producto 100% natural y de origen orgánico que contiene un porcentaje alto de fructosa, además contiene minerales como el hierro, magnesio y otros. Hernández y Reyes (2007) realizaron un estudio de la composición química de piñas de cinco especies de *Agave*, entre ellos *A. potatorum*. Las citadas autoras concluyendo que a pesar de mostrar menor porcentaje de azúcares reductores totales, la miel contuvo mayor proporción de proteína (0.30%), grasa (4.48%) y cenizas (2.86%).

Pacheco (2006) señaló las características principales de la miel de *Agave*:

- Endulzante 100% natural
- Alto poder edulcorante, ya que es 25% más dulce que la glucosa
- En general esta libre de calorías
- Alta solubilidad
- Es tolerada por las personas diabéticas e ideal para los hipoglucémicos
- Regula los niveles de insulina
- Disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos
- Ayudan a la absorción de calcio y magnesio y con ello disminuye la osteoporosis
- Índice glicémico bajo (11), el que genera una ligera variación en el nivel de glucosa en la sangre.

Madrigal-Lugo *et al.* (1989) indican que el contenido de carbohidratos en los magueyes varía de acuerdo a la especie Cuadro 1. *Agave potatorum* contiene la proporción mayor de glucosa.

Cuadro 1. Composición de fructosa y glucosa en la miel de especies de *Agave* utilizadas en la elaboración de bebidas alcohólicas.

Carbohidratos	<i>A. potatorum</i>	<i>A. tequilana</i>	<i>A. cochlearis</i>	<i>A. atrovirens</i>
	(%)			
Glucosa	92	90	88	70
Fructosa	8	10	12	30

La mayor comercialización de miel de maguey es de la obtida de *A. tequilana*; sin embargo, como se muestra en el cuadro anterior, la composición de glucosa y fructosa es semejante a *A. potatorum*, lo que ha generado mayor interés en el estudio del contenido de carbohidratos en esta especie.

Jose (2006) determinó el contenido de azúcares totales (369.79 mg g^{-1}), azúcares reductores (41.46 mg g^{-1}) y fructosa (263.77 mg g^{-1}) en muestras frescas del *A. potatorum* (cultivo de 8 años) durante la hidrólisis de inulina. Los resultados son una muestra del potencial de esta especie en la obtención de edulcorantes.

2.2 PROPAGACIÓN *in vitro*

La micropropagación es una técnica que tiene como objetivo lograr la multiplicación de nuevas plantas en un medio artificial, en condiciones asépticas, a partir de porciones muy pequeñas de plantas. Ésta porción pequeña de planta que se usa para iniciar un cultivo de tejidos se le ha denominado explante. La ventaja principal de esta técnica es la producción grandes cantidades de plantas utilizando un mínimo espacio durante todo el año (Hartmann y Kester, 1994).

El cultivo de tejidos se basa en la totipotencialidad, lo cual significa que una célula vegetal no embrionaria tiene el potencial de desdiferenciarse en una célula embrionaria, posteriormente desarrollarse en un entorno adecuado y generar una nueva planta (Salisbury y Ross, 1994).

Debergh y Zimmerman (1993) indican que el crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por los siguientes factores:

1. Constitución genética de la planta.
2. Nutrientes: agua, macro y micro-elementos y azúcares.
3. Factores físicos que influyen sobre el crecimiento: luz, temperatura, pH, concentraciones de CO_2 y O_2 .
4. Algunas sustancias orgánicas: reguladores del crecimiento, vitaminas, entre otras.

En la regeneración de órganos se distinguen varias etapas como el inicio de división celular en células diferenciadas, principalmente de tipo parénquima, lo que da origen

a grupos de células desdiferenciadas. En la nueva población de células se observan algunas agrupadas en estructuras organizadas denominadas meristemoides, las que darán origen a meristemas y la iniciación de órganos. Este proceso tiene sus propios requerimientos, es decir, es específico para cada especie (Pierik, 1990). Varios autores coinciden que la micropropagación consta de las siguientes fases:

- Iniciación o establecimiento aséptico
- Multiplicación
- Enraizamiento o pre trasplante
- Aclimatación

2.2.1 Medio de cultivo

Hurtado y Merino (1987) mencionan que el éxito que se obtenga de un cultivo de tejidos depende en gran medida del medio nutritivo empleado, como también el uso de tejidos viables, características de incubación, calidad de los reactivos, entre otros. Los componentes comprenden:

- Sales inorgánicas
- Compuestos orgánicos
- Complejos naturales
- Materiales inertes

2.2.1.1 Sales inorgánicas

Existe una gran cantidad de combinaciones nutrimentales en los medios de cultivo para diferentes especies, pero el medio más empleado es el de Murashige y Skoog propuesto en 1962. El contenido de iones (mmol L^{-1}) es la siguiente: amonio 20.612, nitrato 39.405, fosfato monoácido 1.249, potasio 20.042, calcio 2.993, magnesio 1.501, sulfato 1.501 y cloro 5.986. Este medio se utiliza frecuentemente porque la

mayoría de las especies reaccionan positivamente, aunque su principal desventaja es el alto contenido de sales (Pierik, 1990).

Cabe mencionar que algunas especies de *Agaves* se han propagado *in vitro*, y como punto en común han utilizado el medio MS, para dicho fin, solo que han adicionado reguladores de crecimiento, dependiendo de la finalidad del estudio. A continuación se citan sólo algunos.

Robert *et al.* (1987) desarrollaron callos de *A. fourcroydes* a partir de entrenudos de rizoma, posteriormente lograron la organogénesis con una concentración alta de BA (mg L^{-1}) en combinación de 2-4-D.

Powers *et al.* (1989) como explante utilizó una hoja del bulbillo de *A. arizonica* y adicionó al medio MS 0.3 mg L^{-1} de 2-4-D (μM), con ello obtuvo la producción de callo, éste lo subcultivó con 1.0 mg L^{-1} de BA y 0.1 mg L^{-1} de ANA para la producción de brotes.

Binh *et al.* (1990) utilizó rizomas de *A. cantala*, *A. fourcroydes* y *A. sisalana*, como explante en la propagación de yemas axilares de estas especies y medio MS adicionándole 0.5 mg L^{-1} de BA, 0.075 mg L^{-1} de ANA y 0.1 mg L^{-1} .

Santacruz *et al.* (1999) emplearon como explante tallos provenientes de la germinación de semillas de *A. parrasana*, adicionándole al medio MS $2.2 \mu\text{M}$ de 2-4-D.

Hazra *et al.* (2002) utilizaron como explantes hojas jóvenes y maduras y rizoma de *A. sisalana*, adicionándole al medio MS 2-4-D ($9.05 \mu\text{M}$), BA (26.6 mg L^{-1}) y CH (1000 mg L^{-1}) para la producción de brotes.

Pierik (1990) menciona que después de los azúcares, los minerales constituyen el grupo más importante de sustancias nutritivas en el cultivo *in vitro*.

2.2.1.2 Compuestos orgánicos

La principal función de los compuestos orgánicos en el cultivo de tejidos es mejorar el crecimiento, este grupo lo constituyen los azúcares, vitaminas y reguladores de crecimiento.

La sacarosa es la más utilizada como fuente de carbono, también se puede emplear glucosa y fructosa, es el componente esencial para el crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que se sintetiza y se transporta de forma natural en las plantas (Pierik, 1990; Hartman y Kester, 1994). Estos carbohidratos son la fuente de energía metabólica, dentro de ellos están ácidos orgánicos (precursores de aminoácidos), azúcares simples y complejos, polímeros de azúcares como el almidón, celulosa y hemicelulosa (Zelaya, 2002).

López (1990) menciona que las vitaminas son necesarias en la realización de reacciones catalíticas en el metabolismo vegetal y son requeridas en cantidades mínimas, entre ellas se adicionan principalmente tiamina, piridoxina y ácido nicotínico.

Los reguladores de crecimiento (hormonas) son compuestos sintéticos que determinan el crecimiento y desarrollo vegetal y son los responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza. Para el cultivo *in vitro* principalmente se utilizan auxinas (AIA, AIB, ANA, CDA y 2-4 D), citocininas (BA, 2iP, Cin, y Zeatina N⁶), ácido giberélico y ácido abscísico. La concentración empleada depende según la especie (Pierik, 1990).

2.2.1.3 Complejos naturales

Hurtado y Merino (1987) mencionan que los complejos naturales son sustancias enriquecedoras del medio de cultivo, entre ellos se encuentra el extracto de levadura, jugo de tomate y zanahoria, pulpa de plátano y endospermo de coco.

2.2.1.4 Materiales inertes de soporte

La mayoría de los cultivos de tejidos y órganos se cultivan en un medio semisólido de agar que proporciona un buen apoyo para los mismos. Éste es empleado de manera pura en polvo, en una amplitud de concentración de 0.5 a 1.0% y es el material de soporte ampliamente usado en el cultivo de células; otra función es suplir de oxígeno al explante. Además, interviene en la disponibilidad de agua y los componentes disueltos en el medio de cultivo (Hartmann y Kester, 1994; Ramage y Williams, 2002).

González y Manzo (2008) mencionan que el agar es un gel que se extrae de algas marinas y entre las características físicas favorables que presenta son:

- Hierve a 100°C y solidifica a 45°C, esta característica le confiere estabilidad a cualquier temperatura de incubación.
- No es digerido por enzimas de tipo vegetal.
- No reacciona con los constituyentes del medio de cultivo.

Pierik (1990) indica que otra alternativa al uso del agar esta el phytigel, polímeros sintéticos, alginatos y gelrite.

2.3 Nutrición vegetal

Al proceso mediante el cual la planta absorbe del medio que la rodea, los nutrimentos necesarios para llevar a cabo su metabolismo, es definido como nutrición vegetal, es decir, la interrelación de los nutrimentos y el cultivo. Este proceso es vital para su crecimiento y desarrollo (Marschner, 1986; Rodríguez *et al.*, 2007).

Alcántar *et al.* (2007) mencionan que las plantas sintetizan sus propios compuestos metabólicos y estructurales con determinados nutrimentos que se encuentran en el

medio que las rodea, de éstos dependerán la composición mineral de las mismas. Para el crecimiento normal de las plantas se considera sólo 17 elementos, como esenciales, incluyendo C, H y O. Arnon y Stuet en 1939 establecieron las condiciones de la esencialidad de los nutrimentos:

- La ausencia de un nutrimento impide que la planta complete su ciclo de vida.
- Los síntomas de deficiencia deben ser corregidos únicamente cuando la planta es abastecida con el nutrimento correspondiente, es decir, no debe ser sustituido por otro elemento.
- La función en el metabolismo vegetal debe ser conocido.
- Tiene una acción directa en la nutrición de la planta.

Los nutrimentos se clasifican de acuerdo a las funciones específicas en la vida de la planta, las cuales son:

- Estructural: el nutrimento forma parte de la molécula de uno o más compuestos orgánicos. Ejemplo de ello está el N formando parte de aminoácidos y proteínas, Ca como componente de los pectatos, Mg constituyente central del núcleo tetrapirrólico de las clorofilas.
- Constituyente de enzimas: nutrimentos generalmente metales o elementos de transición, que forman parte del grupo prostético de enzimas esenciales en la actividad de las mismas, tal es el caso de los micronutrimentos como Fe, Cu, Zn, Mn, Mo y Ni que participan como cofactores (activadores) enzimáticos.
- Transporte y regulación osmótica: el nutrimento forma enlaces de baja energía (generalmente iónicos) con moléculas orgánicas de bajo peso molecular, favoreciendo su movilidad de un órgano a otro, tal es el caso del K, ión acompañante de los carboxilatos. Éste también se almacena en vacuola regulando procesos de osmorregulación.

2.3.1 Absorción nutrimental

La pared celular de las raíces posee una gran permeabilidad que permite la absorción de los iones, la cual actúa favoreciendo por medio de sus cargas eléctricas la entrada de los iones según la carga. Esta absorción de iones por las raíces es de forma pasiva o activa. En el apoplasto se forma un espacio libre “aparente” en donde las sales circulan de manera pasiva y libre. Este movimiento depende del gradiente de difusión, es decir, las sales se mueven según la diferencia de concentraciones que existen entre un punto y otro (Devlin, 1994).

Los iones van avanzando al interior de la raíz, siguiendo un gradiente de concentración (de mayor a menor concentración); al llegar a la endodermis se encuentra con las bandas de Caspary que son impermeables, y para poder entrar al simplasto deben gastar energía metabólica, constituyendo de esta manera la absorción activa (Gil, 1995).

Las paredes primarias de las células están constituidas de una red de celulosa, hemicelulosa (polisacáridos), pectatos de Ca y Mg y glucoproteínas, que forman una serie de poros y espacios interfibrilares menores de 5 nm. Entre los espacios intercelulares las paredes presentan grupos carboxílicos que sirven como sitios de intercambio catiónico, que pueden variar con las especies (Salisbury y Ross, 1994, Marschner, 1995).

La membrana plasmática está constituida por lípidos (fosfolípidos, glucolípidos y en menor proporción de sulfolípidos y esteroides) y proteínas. Estas últimas forman una capa discontinua que envuelve a la doble capa lipídica y en ocasiones la atraviesan, a este mecanismo se le conoce como puente de proteínas (Salisbury y Ross, 1994).

El transporte de iones y solutos a través de la membrana puede darse a favor del gradiente de concentración, pasando por los poros hidrofílicos o por medio de

transportadores específicos o en contra del gradiente de concentración, realizando un gasto de energía (Marschner, 1995).

Salisbury y Ross (1994), indican que en la membrana celular existen tres tipos de proteínas:

- Catalíticas: la función principal de las ATPasa es hidrolizar al ATP, liberando energía y esta a su vez utilizada en el transporte de iones y solutos.
- Formadoras de canales de solutos: éstas poseen orificios entre las moléculas de las proteínas, donde se difunden los solutos para atravesar la membrana.
- Transportadoras: éstas se combinan con un soluto específico para ser transportados al otro lado de la membrana.

Algunos iones inhiben la absorción de otros, o bien contrarrestan sus funciones metabólicas (antagonismo). Varios autores (Marschner, 1986; Sinha, 2004; Alcántar *et al.*, 2007) coinciden en la forma iónica de absorción en la cual las plantas toman los nutrientes esenciales del medio, sólo se mencionan algunos; N (NO_3^- y NH_4^+), P (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}), K (K^+), Ca (Ca^{2+}), Mg (Mg^{2+}), Fe (Fe^{3+} y Fe^{2+}), Cu (Cu^{2+}), Zn^{2*} y Mn (Mn^{2+}). Cabe mencionar que estos nutrientes se clasifican de acuerdo a su movilidad en el interior de la planta: móviles (N, K, Mg, P, Cl, Na, Zn, Mo y Ni) e inmóviles (Ca, S, Fe, Mn, B y Cu). Alcántar *et al.* (2007) mencionan que la concentración de macronutrientes en el tejido vegetal seco es mayor a 1 000 ppm, mientras que en los micronutrientes se encuentran por debajo de 500 mg kg⁻¹.

Estudios en diversos cultivos, indican que la absorción nutrimental es afectada por varios factores como disponibilidad de los nutrientes (Velázquez, 2008), relación iónica (Ramírez *et al.*, 2010), especie (Calderón, 1995), época del año (Rojas, 2010), etapa fenológica (Martínez, 2006), relación simbiótica con microorganismos (Beltrán-Nambo *et al.*, 2010), entre otros.

2.3.2 Extracción nutrimental

La demanda de un nutrimento por un cultivo está determinada por la producción de biomasa y la concentración del nutrimento en la planta, es decir, al requerimiento interno.

Velázquez (2008) cuantificó la acumulación de biomasa seca y la extracción nutrimental en *Eustoma gradiflorum* Raf. cv. Mariachi en diferentes etapas fenológicas. Obteniendo como resultado que el vástago (tallo y hojas) acumuló la mayor cantidad de biomasa seca ($1906.5 \text{ kg ha}^{-1}$), la mayor extracción total de macronutrientes (kg ha^{-1}) en planta completa fue 24.1 de N, 4.58 de P, 32.61 de K, 7.79 de Ca y 11.0 de Mg, en cuanto a la extracción de los micronutrientes (g ha^{-1}), correspondió a 171.6 de Fe, 38.0 de Cu, 204.1 de Zn y 137.5 de Mn. Siendo el K el macronutriente y el Fe el micronutriente con mayor extracción.

2.4 Potencial osmótico

El potencial osmótico del medio de cultivo in vitro es fundamental para que células, tejidos, órganos o plantas puedan absorber nutrientes de este medio. El principal agente osmorregulador en este tipo de cultivo es la sacarosa que se adiciona a este medio, ésta es portadora de energía y reguladora de la actividad metabólica. En cuanto a los macronutrientes, sus contenidos, también determinan el potencial osmótico y permiten el crecimiento de los explantes (George, 1993).

En cuanto a la célula, los solutos totales (sustancias disueltas) en la vacuola determinan las propiedades osmóticas, es decir, la presión osmótica (Salisbury y Ross, 1994).

El potencial osmótico es una de las características que tienen influencia en el crecimiento, desarrollo, calidad de los cultivos y sus productos de importancia económica.

Raya *et al.* (2010) compararon el enraizamiento *in vitro* en dos genotipos de *Vitis* sp. con tres fuentes de azúcar (sacarosa, glucosa y manitol) en tres concentraciones (43.82, 87.64 y 175.28 mM), el enraizamiento mayor (100%) fue obtenido por el portainjerto "Freedom" y se obtuvo con glucosa, en cuanto a número de raíces en el mismo portainjerto se obtuvo con sacarosa (175.28 mM). También observaron que al aumentar la concentración de azúcares el potencial osmótico disminuyó de -0.26 MPa (43.82 mM de manitol) hasta -0.69 MPa (175.28 mM de sacarosa).

III. OBJETIVOS

General

Determinar el efecto del potencial osmótico del medio de cultivo en la nutrición y producción de biomasa en el cultivo *in vitro* de *Agave potatorum* Zucc.

Específicos

1. Cuantificar el efecto del potencial osmótico sobre el contenido de humedad y producción de materia seca en explantes de *A. potatorum* Zucc.
2. Conocer la absorción nutrimental por explantes de *A. potatorum* Zucc., en función del potencial osmótico.
3. Determinar la extracción nutrimental por explantes de *A. potatorum* Zucc. en función del potencial osmótico.

IV. HIPÓTESIS

General

Cultivos *in vitro* de *Agave potatorum* Zucc. establecidos en medios de cultivo con diferente potencial osmótico no muestran diferencias en la producción de biomasa.

Específicas

1. El potencial osmótico con el menor valor favorece la acumulación de biomasa seca en *A. potatorum* Zucc.
2. El medio de cultivo con el menor potencial osmótico favorece la absorción de nutrientes en los explantes de *A. potatorum* Zucc.
3. El medio de cultivo con menor contenido de sales respecto a la concentración completa de Murashige y Skoog (MS), ocasiona una mayor extracción de nutrientes por explantes de *A. potatorum* Zucc.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación del experimento

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca.

5.2. Material vegetal

Las plántulas cultivadas *in vitro* fueron donadas por el Dr. Raymundo Enríquez del Valle, del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. De las plantas disponibles se seleccionaron las más desarrolladas y sólo se utilizó el cilindro céntrico (zona meristemática) del tallo (1cm) (Nava, 1988) y éste a su vez fue cortado longitudinalmente para obtener dos explantes por tallo (Enríquez y Díaz, 1994).

5.3. Medio de cultivo

Para la preparación del medio Murashige y Skoog (MS) (1962) con concentraciones diferentes de sales (25, 50, 75 y 100%), se emplearon soluciones madre. En el Cuadro 2 se presentan las sales inorgánicas (nitratos, sulfatos, fosfatos, halógenos y quelatos) y compuestos orgánicos (tiamina y benciladenina) por litro de solución. Fueron almacenados en frascos de vidrio, color ámbar y se mantuvieron en refrigeración.

En la Cuadro 3 se muestran las alícuotas usadas de la solución madre para preparar el medio MS con las diferentes concentraciones, las que fueron suplementadas con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 100.0 mg L⁻¹ de mio-inositol como fuente de carbono; todas las soluciones fueron aforadas a un litro con agua desionizada.

El pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH 1N ó HCl 1N, con potenciómetro (Orión Research Digital pH/milivoltimeter 611). Posteriormente se midió la conductividad eléctrica.

Posteriormente, fueron adicionados 5.4 g de agar marca Merck® como sustancia gelificante, por litro de medio y la solución se calentó en una parrilla con agitación magnética, hasta disolver el agar y obtener una solución transparente.

Cuadro 2. Sales inorgánicas empleadas en la preparación de soluciones madre para obtener medio Murashige y Skoog.

Sales inorgánicas		g L ⁻¹
Nitratos	NH ₄ NO ₃	165
	KNO ₃	190
Sulfatos	MgSO ₄ ·7H ₂ O	37
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.23
	ZnSO ₄ ·4H ₂ O	0.86
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025
Halógenos	CaCl ₂ ·2H ₂ O	44.0
	KI	0.083
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Fósforo	KH ₂ PO ₄	17.0
Boro	H ₃ BO ₃	0.62
Molibdeno	Na ₂ MoO ₄	0.25
Quelatos	FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.781
	Na ₂ EDTA	3.731
Compuestos orgánicos		
	Tiamina	0.040
	Benciladenina	0.100

Cuadro 3. Alícuotas de la solución madre para la preparación del medio Murashige y Skoog con concentraciones variables.

Solución madre (mL)	Concentración del medio Murashige y Skoog (%)			
	100	75	50	25
Nitratos	10.0	7.5	5.0	2.5
Fosfatos	10.0	7.5	5.0	2.5
Sulfatos	10.0	7.5	5.0	2.5
Quelatos	10.0	7.5	5.0	2.5
Halógenos	10.0	7.5	5.0	2.5
Tiamina	10.0	10.0	10.0	10.0
Benciladenina	5.0	5.0	5.0	5.0

Se colocaron 20 mL de medio MS en frascos transparentes tipo Gerber® y cada uno se cubrió con una tapa de material conocido como plástico cristal® (No. 16), sujetado con una banda elástica y a la unión del recipiente con su tapa se selló con material plástico adherente Kleenpack® para reducir la probabilidad de contaminación.

Los frascos se esterilizaron en autoclave a 1.5 kg cm^{-3} de presión, temperatura de 120°C , durante 15 minutos.

5.4. Establecimiento del cultivo

En condiciones asépticas, generadas por una campana con flujo laminar horizontal de aire, cajas Petri, pinzas y bisturí esterilizados, se establecieron los explantes en los medios de cultivo.

5.5. Condiciones de incubación

Después de la siembra, los frascos con los explantes se colocaron en una sala de incubación, durante 90 días, con iluminación fluorescente blanca ($25 \mu\text{mol cm}^2\text{seg}^{-1}$ de intensidad), fotoperiodo de 16/8 h y temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$.

5.6. Tratamientos y diseño experimental

En este estudio se instalaron cuatro tratamientos con diferente composición mineral del medio de cultivo MS, 100 % de la concentración se le asignó al tratamiento 1 (T_1), 75 % al tratamiento 2 (T_2), 50 % al tratamiento 3 (T_3) y 25 % al tratamiento 4 (T_4). El tratamiento testigo fue el de la concentración al 100 % (T_1).

El experimento se estableció en un diseño experimental completamente al azar, con cuatro tratamientos y cuarenta y cinco repeticiones por tratamiento.

5.7. Parámetros evaluados

Noventa días después de establecido el experimento en cada unidad experimental se evaluó: contenido de materia fresca y seca y concentración nutrimental.

5.7.1. Materia fresca y seca

En cada unidad experimental se cuantificó la materia fresca (PMF), empleando una balanza analítica. El material posteriormente se secó en una estufa a 65-70⁰C por 72 horas hasta que se obtuvo el peso constante equivalente a la materia seca (PMS). Con estos datos se calculó el porcentaje de agua por medio de la siguiente igualdad:

$$\text{H}_2\text{O} (\%) = \left[\frac{(\text{PMF} - \text{PMS})}{\text{PMF}} \right] \times 100$$

donde:

PMF= Peso de materia fresca (mg brotes⁻¹)

PMS= Peso de materia seca (mg brotes⁻¹)

5.7.2. Concentración nutrimental

Se emplearon extractos para la cuantificación de los siguientes nutrimentos N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mn. Los extractos se obtuvieron por medio de la digestión húmeda diácida del material vegetal deshidratado, la mezcla diácida estaba compuesta por ácido sulfúrico y ácido perclórico (2:1), (Alcántar y Sandoval, 1999).

El nitrógeno se cuantificó por el método semimicro-Kjeldahl

El fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre, zinc y manganeso fueron cuantificados mediante espectrometría de emisión atómica con plasma por inducción acoplada (AES-ICP espectrofotómetro Varian).

5.7.3. Extracción nutrimental

La extracción nutrimental fue calculada a partir del contenido nutrimental y la producción de materia seca, con la siguiente igualdad:

$$N = \frac{PMSXn}{100}$$

donde:

N = Nutrimento extraído ($\mu\text{g brotes}^{-1}$)

PMS = Peso de materia seca (mg)

n = Porcentaje del nutrimento presente en la materia seca (%)

5.7.4. Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia al 95% ($\alpha=0.05$) mediante el Paquete Estadístico SAS (The SAS System for Windows 9.0). Además se hicieron correlaciones entre los tratamientos con diferente potencial osmótico y los resultados de H₂O, PMS, absorción y extracción nutrimental.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Potencial osmótico generado por las sales inorgánicas del medio de cultivo Murashige-Skoog (MS)

El valor del potencial osmótico (PO) de los tratamientos se obtuvo a partir de las lecturas de la conductividad eléctrica (C.E.) (Salisbury y Ross, 1994). En el Cuadro 4 se muestran éstos valores.

Cuadro 4. Tratamientos, concentración, conductividad eléctrica y potencial osmótico (PO) del medio de cultivo Murashige-Skoog.

Tratamiento	Concentración de sales (%)	Conductividad eléctrica dS m ⁻¹	PO MPa
T ₁	100	5.20	-0.187
T ₂	75	3.86	-0.139
T ₃	50	2.60	-0.094
T ₄	25	1.40	-0.050

PO = Potencial osmótico, dS m⁻¹= decisiemens por metro, MPa=megapascales.

Cabe mencionar que de los valores teóricos obtenidos, el T₁ es el potencial osmótico menor (-0.187 MPa), esto debido a la mayor concentración de nutrimentos respecto a los otros tratamientos y que conforme disminuye la concentración el potencial osmótico aumenta.

El estado hídrico de la planta puede fundamentarse mediante el contenido del agua de sus tejidos. El estado puede modificarse con diferentes concentraciones de los componentes del medio de cultivo y puede llegar afectar drásticamente el crecimiento de las plantas (Pierik, 1990).

6.2 Efecto del potencial osmótico del medio de cultivo MS en brotes de *A. potatorum* Zucc

Los cuatro niveles del potencial osmótico evaluados presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el contenido de humedad, proporción de materia seca y húmeda, concentración y extracción nutrimental, excepto en la concentración de cobre. También se observó que al aumentar la concentración de solutos del medio, el valor del potencial osmótico incrementó hasta -0.187 MPa, es decir, las repuestas de fueron inversamente proporcionales al efecto del potencial osmótico del medio. Las respuestas de los tejidos a los potenciales bajos están relacionados con su ajuste osmótico. En el presente estudio, la respuesta inversa señalada también puede fundamentarse a la reacción de las células de los explantes a los potenciales osmóticos bajos del medio que condujo a la expresión de una mayor capacidad de ajuste osmótico (Medrano *et al.*, 2007).

6.2.1 Porcentaje de humedad y peso de materia seca

Se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en H_2O y contenido de materia seca en los brotes cultivados *in vitro*, por efecto del potencial osmótico del medio (Cuadro 3).

Cuadro 5. Porcentaje de humedad (% H_2O) y peso de materia seca (PMS) en brotes de *Agave potatorum* Zucc cultivados *in vitro* en el medio de cultivo Murashige-Skoog, con potencial osmótico diferente.

PO MPa	H_2O (%)	PMS mg brote ⁻¹
-0.187	93.74 a	350.44 a
-0.139	93.14 a	328.11 ab
-0.094	92.20 ab	292.69 ab
-0.050	90.65 b	264.13 b*
DMS	1.77	0.07
CV	3.49	42.29

PO=potencial osmótico, MPa=megapascuales; H_2O =porcentaje de humedad; PMS=peso de materia seca. *Medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$). DMS=diferencia mínima significativa. CV=coeficiente de variación.

En las plantas superiores la mayor parte del material vegetal está constituido por agua (90-95%), contenida en diferentes proporciones entre sus tejidos que depende de la actividad metabólica de cada una de sus estructuras anatómicas (Gil, 1995).

Los brotes de *A. potatorum* Zucc cultivados *in vitro*, a partir de los explantes que se establecieron en el medio MS con el potencial osmótico menor PO (-0.187 MPa), presentaron el contenido de humedad mayor (93.74 %) (Cuadro 5), valores semejantes al obtenido en este estudio son los reportados por Gil (1995). Además, los resultados muestran que la disminución del potencial osmótico del medio incrementó el contenido de H₂O del tejido, es decir, que el contenido de H₂O fue inversamente proporcional al potencial osmótico del medio (Figura 5). Sin embargo, de acuerdo con la comparación estadística de medias (Tukey $\alpha=0.05$) el contenido de H₂O de los brotes con potencial osmótico de -0.187 MPa, -0.139 MPa y -0.094 MPa fue similar, pero significativamente mayores, 3.3% de H₂O, respecto a los brotes establecidos en el medio MS, con 25% de la concentración original de sales (potencial osmótico de -0.050 MPa).

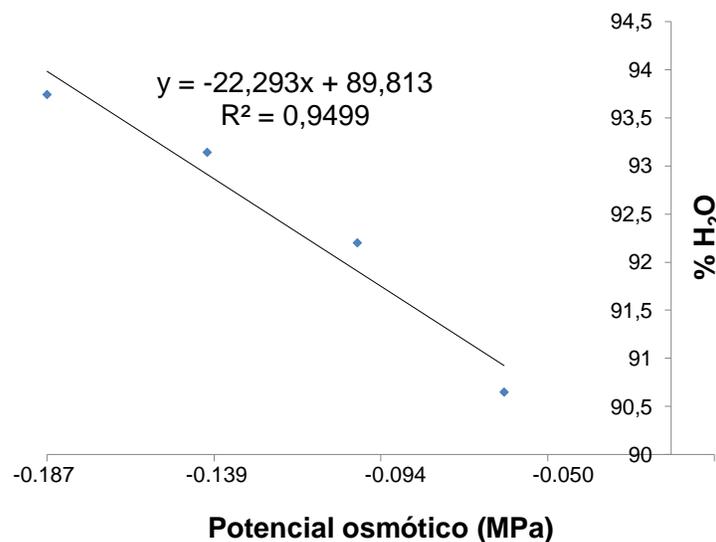


Figura 5. Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y el %H₂O en *Agave potatorum* Zucc.

Magdaleno *et al.* (2006), obtuvieron resultados similares en el desarrollo de plántulas de *Physalis ixocarpa* Brot. 29 días después de la siembra, ya que al incrementar la concentración de nutrimentos en la solución de Steiner, disminuyó el potencial osmótico, se produjo un aumento del 3.0% de H₂O en los tejidos, respecto al testigo.

El crecimiento vegetal se ve afectado (positiva o negativamente) por el estrés osmótico, y depende de la capacidad de las plantas para absorber e incorporar los nutrimentos a su metabolismo (Casierra-Posada y García, 2005).

Morard y Henry (1998) indicaron que el potencial osmótico del medio de cultivo tiene efecto directo en los explantes. Conforme el potencial osmótico disminuye la absorción de agua será menor y por consecuencia habrá disminución de la multiplicación de brotes debido a la disponibilidad baja de agua.

El crecimiento y organogénesis de los explantes se detienen cuando el potencial osmótico del medio es notablemente bajo -0.3 MPa, ya que en esas condiciones la absorción de agua es baja (Pierik y Steegmans, 1975).

El PMS promedio en los brotes de la especie en estudio fue significativamente superior (350.44 mg brote⁻¹) en el medio de cultivo con el potencial osmótico menor (-0.187MPa) o con la cantidad mayor de solutos (Figura 6). Al contrario, los explantes que se establecieron en el medio con la concentración menor de solutos (25 %) y por consiguiente con el potencial osmótico mayor (-0.050 MPa) representaron valores menores (25.63 %) de PMS.

Sonneveld (2004) menciona que el incremento de la concentración de nutrimentos tiene un efecto directo en el contenido de materia seca. Sin embargo, de acuerdo con la comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$) el PMS establecidos en el medio con 100 %, 75 % y 50 % de la concentración de sales fue similar (292.64 a 350.44mg brotes⁻¹) entre sí pero significativamente superiores al 16.5% de PMS en los brotes establecidos en el medio con 25 % de sales.

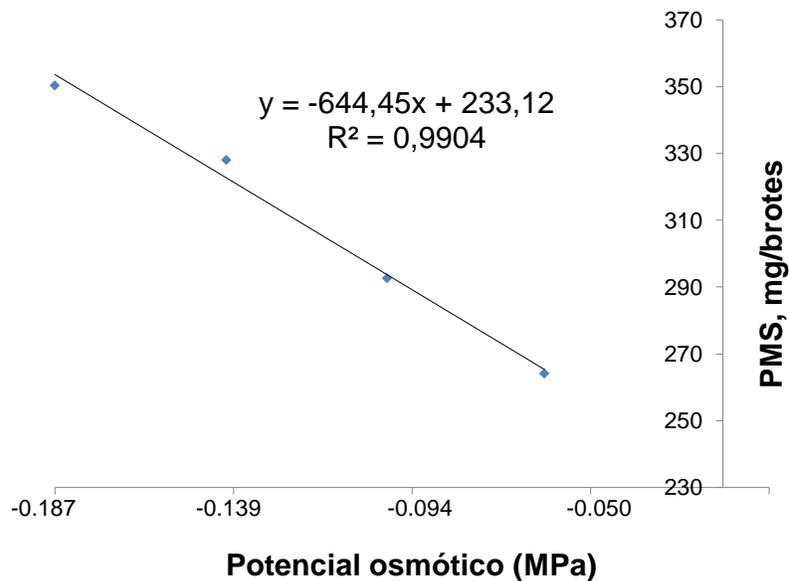


Figura 6. Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y peso de materia seca en *Agave potatorum* Zucc.

Molinos *et al.* (2004) observaron el efecto contrario en explantes *in vitro* del portainjerto de vid "R110" en el que se evaluaron diferentes potenciales osmóticos (-0.106, -0.113, -0.120, -0.128, -0.143 y -0.157 MPa) en el medio de cultivo. Estos autores encontraron el PMS mayor de 57.0 mg explante⁻¹ con el potencial osmótico mayor (-0.106 MPa).

6.2.2 Concentración N, P y K en brotes de *A. potatorum* Zucc. cultivados *in vitro*

Para determinar los elementos minerales del material vegetal, se procede a la combustión de la materia seca, en este proceso primeramente se separa la fracción orgánica (CO₂, NH₃ y H₂O) de la inorgánica (cenizas). En la etapa final del proceso, por calcinación, se obtienen todos los elementos minerales, pero no su composición y grado de oxidación no se conserva (Gil, 1995).

Para conocer la absorción nutrimental de los brotes de *A. potatorum* Zucc *in vitro*, fue necesario determinar la concentración promedio de los macronutrientes N, P, K, Ca y Mg (%) y de los micronutrientes Fe, Cu, Zn y Mn (ppm) en la materia seca.

Se observan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) en la concentración promedio de nitrógeno, fósforo y potasio en los brotes por efecto del potencial osmótico (Cuadro 6).

6.2.2.1. Nitrógeno

El crecimiento y desarrollo adecuados de los cultivos, es resultado del balance nutrimental. Al incrementar la concentración de N, los otros nutrientes deben estar presentes en cantidades precisas, si esto no ocurre, el efecto positivo del suministro del N se reducirá significativamente (Parker, 2000).

Cuadro 6. Concentración (%) de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) en brotes de *Agave potatorum* Zucc cultivados *in vitro* en dependencia del potencial osmótico (PO) del medio de cultivo Murashige-Skoog.

PO	N	P	K
MPa	————— (%) —————		
-0.187	2.97 a	0.21 a	5.40 a
-0.139	2.67 a	0.17 b	2.17 b
-0.094	1.84 b	0.16 b	1.89 b
-0.050	1.26 c	0.11 c	1.04 c*
DMS	0.54	0.03	0.80
CV	45.16	36.93	55.71

PO = potencial osmótico, MPa=megapascuales. *Medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$). DMS=diferencia mínima significativa. CV=coeficiente de variación.

En la planta, el nitrógeno es el nutriente esencial que se encuentra tanto en forma inorgánica (NO_3^-) como orgánica (NH_4^+). Combinado con el carbono, hidrógeno y oxígeno y en algunas veces con el azufre forma aminoácidos, enzimas, ácidos nucleicos, clorofilas, alcaloides y purinas (base nitrogenada). El amonio es absorbido y utilizado fundamentalmente por plantas jóvenes, mientras que el nitrato es la fuente

principal de N utilizada durante el periodo de crecimiento. Este nutrimento como componente de la materia seca se encuentra entre 1.5 y 6.0%. (Benton *et al.*, 1991; Urrestarazu, 2004).

La mayoría de los valores de N encontrados en los brotes de *A. potatorum* Zucc dependientes del potencial osmótico, se ubican dentro de las concentraciones en la materia seca reportadas por Benton *et al.*, (1991). La concentración mayor de N (2.97%) fue detectada en los explantes desarrollados en el medio con potencial osmótico menor (-0.187 MPa). En contraste, el medio con el potencial osmótico mayor (-0.050 MPa) representó menos N (57 %). La proporción menor de N en este tratamiento, parece resultado de la disminución de la absorción de agua y nutrimentos. Los resultados muestran que la absorción de N en los explantes aumentó a medida que el potencial osmótico decreció (Figura 7).

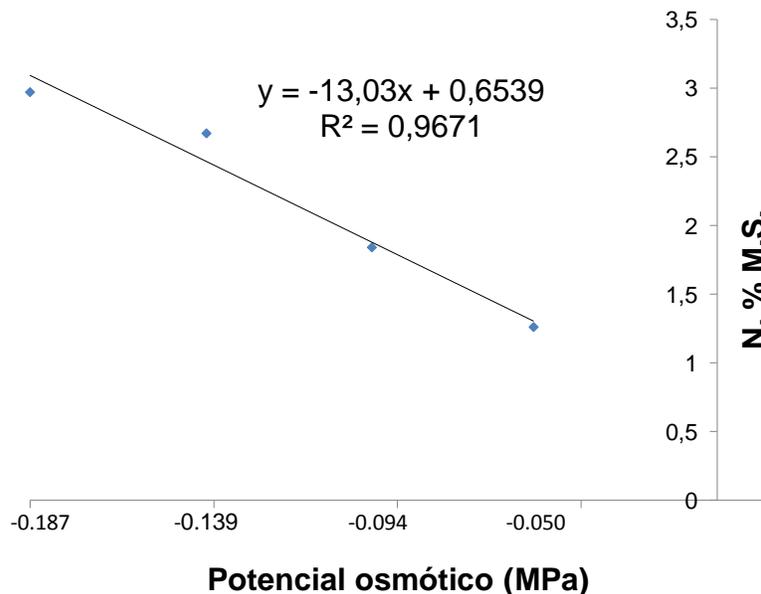


Figura 7. Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y el % de nitrógeno en *Agave potatorum* Zucc.

Enríquez *et al.* (2000) indicaron que en plántulas de *Lycopersicon esculentum* Mill. var Daniela *in vitro*, la concentración nutrimental promedio de N en la parte aérea

aumentó en respuesta a la mayor aplicación de fertilización, es decir, con el potencial osmótico menor (-0.072 MPa).

6.2.2.2. Fósforo

El fósforo es absorbido de forma aniónica, como fosfato monovalente (H_2PO_4^-) y con menor velocidad como fosfato divalente ($\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$). Este nutrimento es un componente de ácidos nucleicos, fosfoproteínas, fosfolípidos como lecitinas (constituyentes de las membranas citoplasmáticas), así como de enzimas y otras proteínas. Entre las funciones más conocidas del fósforo está el almacenamiento y transferencia de energía cuando forma parte de la molécula de ATP (adenosín-trifosfato), ADP (adenosín-difosfato), AMP (adenosín-monofosfato) y PPI (pirofosfato); también forma parte del ciclo reproductivo, al ser uno de los componentes del ADN y ARN, ya que participa en la transferencia de información genética. Este nutrimento como componente de la materia seca se encuentra entre 0.15 y 1.0 %. (Benton *et al.*, 1991; Salisbury y Ross, 1994; Tisdale *et al.*, 1993).

El aumento de la concentración de fósforo en el medio puede limitar la disponibilidad de otros iones como el Fe^{3+} , Ca^{2+} y Zn. Un ejemplo de la relación entre P y Zn es la observada en plantas *in vivo* de *Zea mays*, en las que al incrementar la dosis de P de 300 a 600 ppm, la producción de materia seca y la concentración de Zn se redujeron drásticamente en el tejido (5 ppm), es decir, la planta no absorbió las cantidades necesarias de Zn por la concentración alta de P (Malavolta, 1986; Loneragan y Asher, 1982).

La concentración nutrimental de P en los brotes de *A. potatootum* Zucc, mostrará diferencias significativas ($\alpha=0.05$) por efecto del potencial osmótico, pero corresponden al intervalo reportado por Benton *et al.* (1991). Al disminuir el potencial osmótico la concentración nutrimental de P se incrementa, es decir, la concentración de P fue inversamente proporcional a la disminución del potencial osmótico (Figura 8). Ya que, con -0.187 MPa en el medio la concentración de P fue la mayor, 0.21 %; en

contraste, con -0.050 MPa mostró una disminución del 47.6 %. La comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$) indicó que el medio con 75 % de sales mantuvo la concentración nutrimental de P respecto a la concentración de 50 % (Cuadro 6).

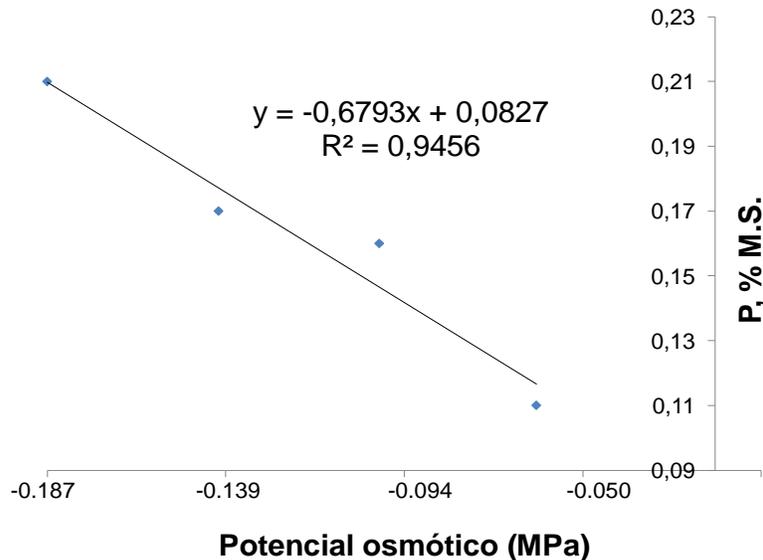


Figura 8. Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y el % de fósforo en *Agave potatorum* Zucc.

Villegas-Torres *et al.* (2005) evaluaron tres niveles de potencial osmótico (-0.072, -0.092 y -0.112 MPa) en la solución “universal” de Steiner para la producción de plántulas de *Lycopersicon esculentum* Mill. híbrido Daniela. La absorción mayor de P (13.0 mg kg⁻¹) la obtuvieron con el potencial osmótico menor (-0.112 MPa).

El efecto similar del potencial osmótico se observó sobre la absorción nutrimental de P en hojas de *Capsicum pubescens* R. y P., en las que se evaluaron cinco niveles de potencial osmótico (-0.108, -0.090, -0.072, -0.054 y -0.036 MPa) y en las que se observaron diferencias significativas ($\alpha=0.05$), con la absorción mayor de P (0.20%) con el potencial osmótico menor (-0.108 MPa). Lo anterior, mostró también una relación inversa entre la concentración de P y el potencial osmótico del medio (Bautista, 2010).

6.2.2.3. Potasio

Este nutrimento tiene un papel importante en el potencial osmótico de las células, ya que es requerido para incrementar el turgor de las células oclusivas, encargadas de la apertura de los estomas. Además, su movilidad alta dentro de la planta es a través de mecanismos selectivos de transporte. Es activador de numerosas enzimas (algunas participan en la síntesis de almidón y proteínas), que son esenciales en la fotosíntesis y la respiración. Este catión como componente de la materia seca se encuentra en proporciones entre 1.0 y 5.0 %, es decir, es absorbido en mayor cantidad por las plantas y en la mayoría de los vegetales el contenido de K sobrepasa a otros cationes alcalino y alcalino térreos. A pesar de su gran importancia, aun se desconoce, en el caso de estar combinado con grandes biomoléculas, cómo se encuentra unido este nutrimento (Huber, 1985; Benton *et al.*, 1991; Salisbury y Ross, 1994; Ramage y Williams, 2002).

De los cinco macronutrientes evaluados en este estudio, el K presentó la mayor concentración promedio (1.04 % y 5.4 %) en los brotes de la especie estudiada (Cuadro 4): Lo anterior confirmó que la abundancia de este nutrimento contribuye de manera importante al potencial osmótico de las células y por consiguiente a la presión de turgencia (Salisbury y Ross, 1994).

En los brotes de *A. potatorum* Zucc la concentración promedio de K, entre 1.04 y 5.40 %, mostró diferencias significativas por efecto del potencial osmótico; estos valores son coincidentes con la concentración de este nutrimento en materia seca reportado por Benton *et al.* (1999). La mayor concentración promedio de K (5.4 %) correspondió a los explantes en el medio con el potencial osmótico menor (-0.187 MPa), mientras que el potencial osmótico mayor (-0.050 MPa) produjo una reducción significativa del 80 %. Así, es posible indicar que la concentración media de este nutrimento fue inversamente proporcional al potencial osmótico del medio (Figura 9).

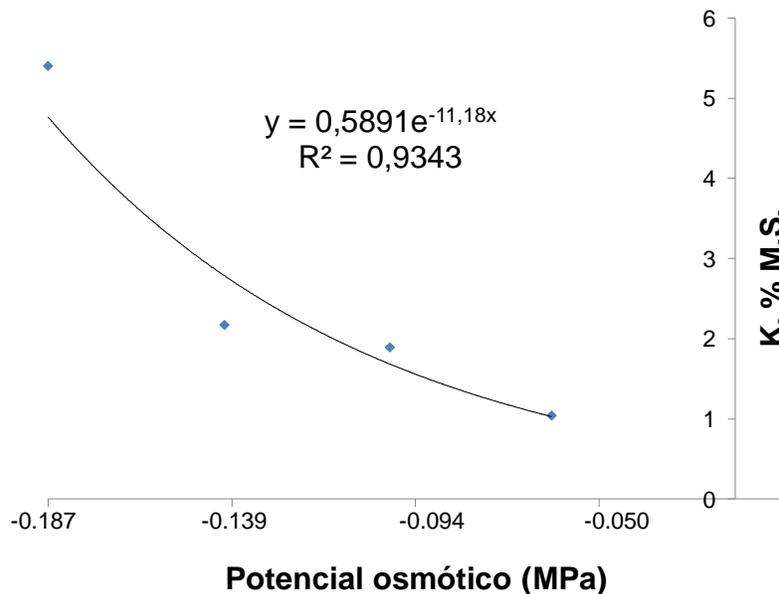


Figura 9. Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y el % de potasio en *Agave potatorum* Zucc.

De acuerdo con la comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$), la acumulación de K en las *in vitro* plantas establecidas en medio con potenciales osmóticos de -0.094 MPa fue similar al del medio con -0.139 MPa.

Parra *et al.* (2009) estudiaron los efectos del Si y el potencial osmótico de la solución nutritiva de Steiner en la composición y distribución de nutrientes en *Cucumis sativus* L. En el caso específico del K, la mayor absorción (17.7 g kg^{-1}) se obtuvo con el potencial osmótico de -0.080 MPa, y el efecto del menor de -0.150 MPa fue la reducción de 15% de la absorción de este nutriente.

6.2.3 Concentración de Ca y Mg en brotes de *Agave potatorum* Zucc cultivados *in vitro*

Se observaron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos para la concentración nutrimental de calcio y magnesio en los brotes, por efecto del potencial osmótico del medio (Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentración (%) de calcio (Ca) y magnesio (Mg) en brotes de *Agave potatorum* Zucc cultivados *in vitro* respecto al potencial osmótico del medio de cultivo Murashige-Skoog.

Potencial osmótico	Ca	Mg
MPa	----- % -----	
-0.187	0.40 a	0.21 a
-0.139	0.30 b	0.19 a
-0.094	0.31 b	0.14 b
-0.050	0.23 c	0.11 c*
DMS	0.07	0.03
CV	36.78	32.44

MPa=megapascales. *Medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$). DMS=diferencia mínima significativa. CV=coeficiente de variación.

6.2.3.1. Calcio

En las plantas, este nutrimento puede presentarse como catión divalente libre o en forma adsorbida. Puede decirse que las necesidades de las plantas por este nutrimento son menores en comparación con el K. En las especies vegetales los requerimientos de Ca difieren ampliamente, ya que se ha señalado que las dicotiledóneas requieren cinco veces más suministro que las monocotiledónas. La proporción de Ca en la materia seca oscila entre 0.2 y 3.0 % (Benton *et al.*, 1999; Taiz y Zeiger, 1998; Resh, 2001).

En los tejidos meristemáticos, el Ca^{2+} desempeña un papel fundamental en la multiplicación y elongación celular, ya que se requiere de él para la formación de la lámina media en la placa celular que surge entre las células hijas. A nivel celular el Ca^{2+} se distribuye de la siguiente manera: vacuola>pared celular>retículo endoplasmático>plasmalema >citoplasma. La mayor presencia del Ca^{2+} en la vacuola se debe a que forma parte de las moléculas de oxalato de calcio y en menor proporción se une a los carbonatos, fosfatos o sulfatos insolubles, esto depende de la especie vegetal. El Ca^{2+} en contraste con el Mg^{2+} , al parecer no puede ser adsorbido

por las células translocadoras del floema, en consecuencia, los síntomas de deficiencia regularmente son más acentuados en los tejidos jóvenes.

Se conocen algunas enzimas que son activadas por el Ca^{2+} , entre ellas, la más importante es la calmodulina, el proceso se da cuando el Ca ubicado en el citosol se une a la proteína, lo que origina un cambio en la estructura de la enzima y, en consecuencia, la activación de otras enzimas (reacción en cadena). También participa en el mecanismo de acción de las citocininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico, acetilcolina y el fitocromo. Existen hipótesis que señalan que los iones de Ca^{2+} desempeñan un papel fundamental en la síntesis de las auxinas, ya que los cationes funcionan como mensajeros de segundo y tercer orden en la conducción de señales (Salisbury y Ross, 1994; Alcántar *et al.*, 2007).

En el Cuadro 7 se muestra el contenido promedio de Ca en brotes de *A. potatozum*; es posible asegurar que la concentración de Ca fue inversamente proporcional al potencial osmótico del medio (Figura 10). Los resultados muestran que el tratamiento que obtuvo la concentración promedio mayor de Ca (0.40 %) correspondió al potencial osmótico menor (-0.187 MPa), y al contrario, la concentración promedio menor (0.23 %) correspondió al potencial osmótico mayor (-0.050 MPa). Es decir, se cuantificó una reducción del 42.5 %. Sin embargo, el resultado fue significativamente similar entre los potenciales osmóticos correspondientes al 50 y 75 % de sales del medio MS. En estos casos las concentraciones promedio de Ca fueron de 0.30 y 0.31 %, respectivamente. Los valores de la concentración de Ca por efecto de los cuatro niveles de potencial osmótico evaluados de este estudio están dentro del intervalo reportado por Benton *et al.* (1999).

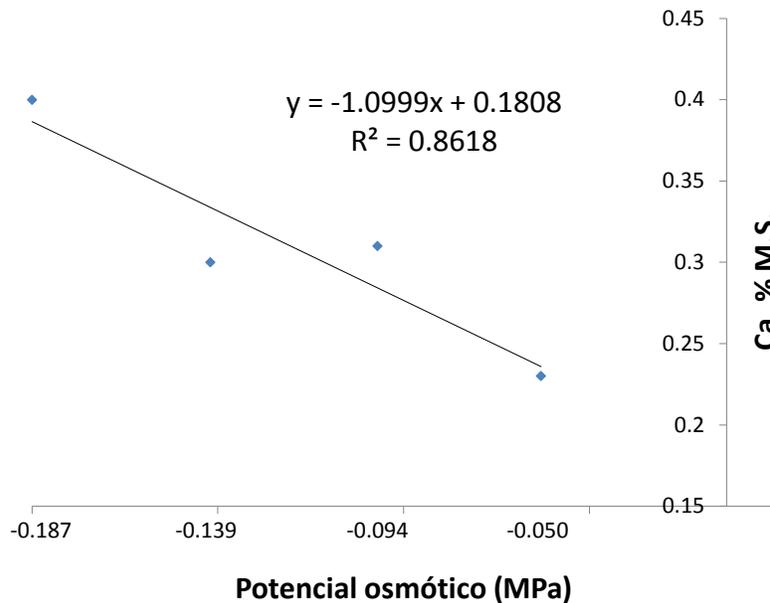


Figura 10. Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y el % de calcio en *Agave potatorum* Zucc.

Concentración similar de este nutrimento se observó en *Capsicum annum* L. var Grossum sendt, al evaluar su crecimiento y dinámica nutrimental en cuatro concentraciones de la solución nutritiva de Steiner (50, 75, 100 y 125 %) en condiciones de invernadero. El valor promedio de contenido de Ca (1.61 %) mostró diferencias significativas después de 45 días del trasplante y correspondió a la solución de Steiner al 125 % (Martínez, 2006).

6.2.3.2. Magnesio

En las plantas el Mg^{2+} es absorbido y acumulado en cantidades menores que el Ca^{2+} y el K^+ y similares al P y S. La concentración de este nutrimento se encuentra entre 0.15 % y 1.8 % en la materia seca. En el nivel celular se une principalmente a través de enlaces tipo iónico. Entre las funciones que desempeña el Mg^{2+} en la célula está la regulación de pH celular y el balance anión- catión, pero las más importantes son las relacionadas con su papel constitutivo de la clorofila (átomo central de la

molécula) y los ribosomas. Son muchas las reacciones enzimáticas que requieren o que son activadas por el Mg^{2+} , la reacción enzimática clave es la regulación de RuBP carboxilasa en el estroma, en el cloroplasto, ya que la actividad de esta enzima es altamente dependiente del Mg^{2+} y del pH (Benton *et al.*, 1999; Hopkins, 1999; Alcántar *et al.*, 2007).

Los brotes que presentaron la mayor absorción de Mg fueron los que se mantuvieron en el medio con los potenciales osmóticos de -0.187 MPa y -0.139 MPa, y de acuerdo a la comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$) el efecto fue similar con ambos potenciales (Cuadro 7). También se observó que existieron diferencias significativas con los potenciales de -0.094 MPa y -0.050 MPa, éste último fue el que generó la menor absorción promedio de Mg, 0.11 % (Figura 11). Las diferentes concentraciones de Mg encontradas en este estudio se encuentran en el intervalo (0.15 y 1.8%) reportado por Benton *et al.* (1999).

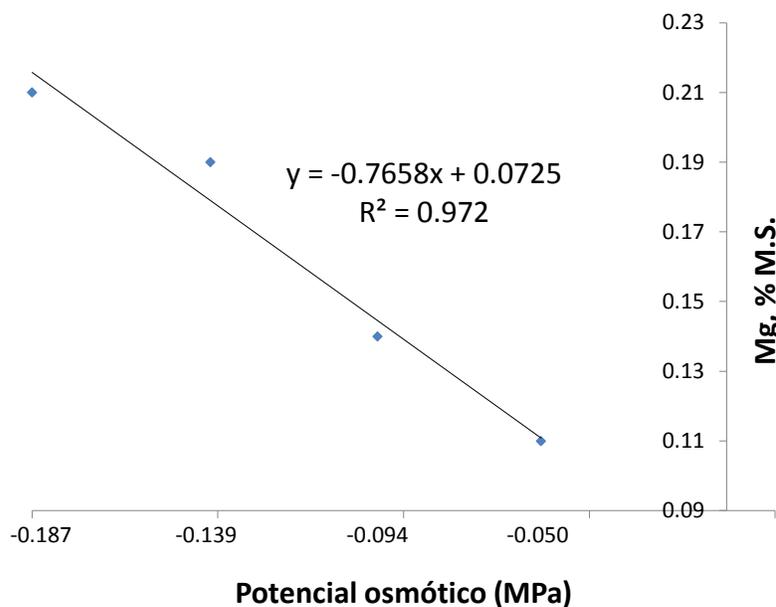


Figura 11. Relación entre el potencial osmótico de las sales inorgánicas del medio MS y el % de magnesio en *Agave potatorum* Zucc.

También, se observó que en la absorción nutrimental promedio de *A. potatorum*, en este estudio el Mg^{2+} particularmente fue absorbido y acumulado en cantidades menores que el K^+ y Ca^{2+} . Lo anterior coinciden con lo señalado por Alcántar *et al.* (2007).

Calderón (1995) evaluó el efecto de la salinidad en la producción de materia seca y absorción nutrimental de plantas micropropagadas de *Opuntia* spp. El citado autor concluyó que después de 209 días del trasplante, la concentración de Mg se afectó por el gradiente de salinidad de la solución nutritiva, la absorción media mostró diferencias significativas, ya que el nivel menor de salinidad (2 milisiemens) se obtuvo el contenido mayor de Mg ($233.9 \text{ mg planta}^{-1}$); en contraste, el nivel mayor de salinidad (17 milisiemens) generó el contenido menor ($24.7 \text{ mg planta}^{-1}$), lo que correspondió a un decremento del 89.4 %.

En resumen, las concentraciones promedio de los macronutrientes N, P, K y Ca (Cuadros 6 y 7) mostraron que la mayor absorción nutrimental se originó por el efecto del tratamiento con 100 % del medio MS; es decir, con el potencial osmótico menor, de -0.187 MPa . La absorción nutrimental mayor de Mg se presentó en dos tratamientos, con el medio MS al 100 y 75 %, y entre ellos las diferencias no fueron significativas, de acuerdo a la comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$).

Además, de acuerdo con las concentraciones promedio obtenidas en la materia seca (Figura 12), se observó que el K (5.4 %) es el nutriente que estuvo presente en mayor cantidad, fue seguido por el N (0.76 %), Ca (0.40 %), P (0.21 %) y finalmente Mg (0.21 %).

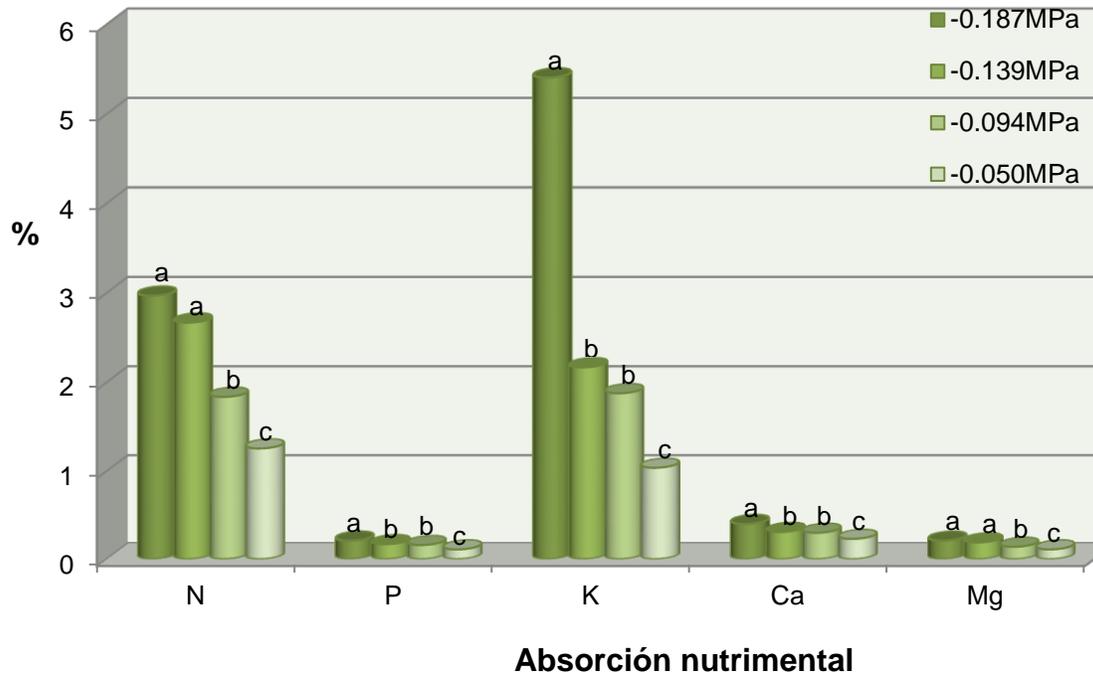


Figura 12. Efecto del potencial osmótico del medio de cultivo Murashige y Skoog en el contenido de N, P, K, Ca y Mg en brotes de *Agave potatorum* Zucc. cultivados *in vitro*.

6.2.4 Concentración de micronutrientos (Fe, Cu, Zn y Mn) en brotes de *Agave potatorum* Zucc cultivados *in vitro*

Benton *et al.* (1999) mencionan que en la materia seca de la mayoría de los cultivos el contenido de micronutrientos es Fe entre 10 y 1000 ppm, Cu entre 3 y 7 ppm, Zn entre 15 y 50 ppm y Mn entre 10 y 50 ppm. Las concentraciones encontradas en el presente estudio mostraron que sólo el Fe estuvo en el intervalo señalado anteriormente. En contraste, los otros tres micronutrientos rebasaron las concentraciones antes citadas. Granados (1993) indicó que las plantas del género *Agave* toleran concentraciones altas de Ca y metales pesados como Cu y Zn.

Se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en la concentración de micronutrientos, con excepción del cobre. Además, se observó que las concentraciones de los micronutrientos fueron inversamente proporcionales al potencial osmótico del medio de cultivo (Cuadro 8).

Cuadro 8. Concentración de micronutrientos (Fe, Cu, Zn y Mn) en brotes de *Agave potatorum* Zucc *in vitro* en dependencia del potencial osmótico del medio de cultivo Murashige-Skoog.

Potencial osmótico	Fe	Cu	Zn	Mn
MPa	ppm			
-0.187	244.03 a	23.55 a	107.66 a	152.79 a
-0.139	219.37 a	18.10 a	78.76 b	139.06 a
-0.094	211.52 a	14.66 a	76.96 b	92.52 b
-0.050	134.87 b	14.55 a	52.64 c	59.06 c*
DMS	40.11	11.37	17.24	20.07
CV	36.12	11.05	40.56	32.99

MPa=megapascales. * Medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$). DMS=diferencia mínima significativa. CV=coeficiente de variación.

6.2.4.1. Hierro

En la planta este nutriente es absorbido como Fe^{3+} (catión férrico), Fe^{2+} (catión ferroso) o como quelato. La variabilidad de estados de reducción en los que este elemento puede encontrarse, permite que entre sus funciones fisiológicas más importantes estén la afinidad en la formación de compuestos quelatados y la capacidad alta para cambiar de valencia; es decir, sobresale por su capacidad para ganar y ceder electrones en reacciones redox. La concentración de Fe en los tejidos vegetales secos varía entre 10 y 1000 ppm; sólo una pequeña parte del Fe total en la planta es soluble en agua y del 80 al 90 % se encuentra unido fuertemente a las moléculas orgánicas (ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y flavinas), las que, generalmente son moléculas específicas, transportadoras del Fe. Este elemento es cofactor de más de 130 enzimas, que catalizan reacciones bioquímicas únicas e interviene en procesos como la fotosíntesis, respiración, reducción de nitratos y sulfatos (Benton *et al.*, 1999; Alcántar *et al.*, 2007).

El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la concentración promedio de Fe entre los tratamientos. Los potenciales osmóticos -0.187, -0.139 y -0.094 MPa, de los tratamientos con 100, 75 y 50 % de solutos, respectivamente, generaron acumulaciones de Fe estadísticamente iguales entre sí, de acuerdo con el análisis estadístico (Tukey $\alpha=0.05$); a la vez, estos tres tratamientos presentaron la absorción mayor de Fe en los brotes de *A. potatorum* Zucc. Además, se observó que la absorción menor (134.87 ppm) de Fe fue generada por el medio con el potencial osmótico mayor (-0.050 MPa); lo anterior correspondió a una reducción significativa del 44.7 % (Cuadro 8).

6.2.4.2. Cobre

En los brotes de *A. potatorum* Zucc, la concentración promedio de Cu por efecto del potencial osmótico del medio estuvo entre 23.55 y 14.55 ppm, y fue significativamente similar entre los tratamientos. A pesar de esa similitud estadística, se observó una tendencia de absorción mayor de este micronutriente en el tratamiento con el potencial osmótico menor (-0.187 MPa), la que superó en un 38 % al tratamiento con el potencial mayor (-0.050 MPa) (Cuadro 8).

6.2.4.3. Zinc

En plantas superiores el zinc es absorbido en cantidades pequeñas como catión divalente (Zn^{2+}); su concentración varía entre 15 y 50 ppm en los tejidos secos. Su función metabólica está relacionada con su presencia en compuestos tetraédricos con N, O y S; el papel que desempeña es funcional (catalítico), es decir en reacciones enzimáticas y estructural. El Zn, junto con el Cu y Mn, forma parte de algunas superóxido dismutasas (SOD). Este elemento, también es parte estructural de los ribosomas ya que es indispensable en la síntesis de proteínas; y posiblemente, se requiere para la síntesis del ácido indolacético (AIA) (Benton *et al.*, 1999; Salisbury y Ross, 1994; Sinha, 2004; Alcántar *et al.*, 2007).

El contenido de Zn mostró diferencias significativas entre los tratamientos. La absorción promedio mayor del Zn (107.66 ppm) se presentó en el medio con el potencial osmótico menor (-0.187 MPa); en contraste, la concentración menor (52.64 ppm) de este elemento lo presentaron los explantes en el medio con potencial osmótico mayor (-0.050 MPa). Así, puede señalarse que se estableció una relación inversa entre la asimilación de Zn y el potencial osmótico del medio (Cuadro 8). Sin embargo, los potenciales intermedios, los generados con las concentraciones de solutos de 75 y 50 % del medio MS, la absorción de Zn fue significativamente similar (Tukey $\alpha=0.05$)

Las concentraciones promedio de este micronutriente en la materia seca de *A. potatozum* superaron las reportadas por Benton *et al.* (1999).

6.2.4.4. Manganese

El manganeso es absorbido principalmente como catión divalente Mn^{2+} (ión manganeso) por las plantas; aunque, también puede ser incorporado con otros estados de oxidación. Su contenido en la materia seca oscila entre 10 y 50 ppm. El Mn participa en los procesos redox (óxido-reducción), descarboxilación e hidrólisis enzimática. Es un activador de alrededor de 35 enzimas; aunque, se sabe que sólo dos enzimas tienen al Mn como constituyente, estas son la que fotolisa el agua en el PS II (manganeso proteína del fotosistema II) y la Mn-SOD (superóxido dismutasa). Así, el Mn interviene en las reacciones primarias de liberación de oxígeno, mediante la fotólisis del agua (reacción de Hill) (Benton *et al.*, 1999; Salisbury y Ross, 1994; Alcántar *et al.*, 2007).

El contenido promedio en Mn de los brotes de *A. potatozum* fue inversamente proporcional al potencial osmótico del medio de cultivo MS y el análisis estadístico mostró que existieron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 8).

La mayor absorción se realizó en los tratamientos con los potenciales osmóticos de -0.187 y -0.138 MPa), generados con 100 % y 75 % de solutos originalmente contenido en el medio MS. De acuerdo con la comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$) estos dos tratamientos incorporaron cantidades similares de Mn. En contraste, la absorción promedio menor de Mn (59.06 ppm) la presentaron los explantes en el medio con el potencial osmótico mayor, correspondiente a -0.050 MPa, esta absorción mostró una disminución del 61.3 % respecto a la que presentaron los explantes en el medio con el potencial de -0.138 MPa.

Como en el caso de otros micronutrientes, la concentración media de Mn en los diferentes potenciales osmóticos evaluados en este estudio, también superaron a los reportados por Benton *et al.* (1999).

En la Figura 13 se presenta la absorción media de micronutrientes por los explantes de *A. potatoorum* en el medio con los diferentes potenciales osmóticos evaluados. En esta figura se evidencia la relación opuesta entre la concentración de los micronutrientes y el valor del potencial; es decir, la absorción mayor de micronutrientes se llevó a cabo en los tratamientos con el potencial osmótico menor y viceversa. También, la Figura 13 muestra que la absorción entre los micronutrientes presentó un gradiente en el siguiente orden Fe>Mn>Zn>Cu.

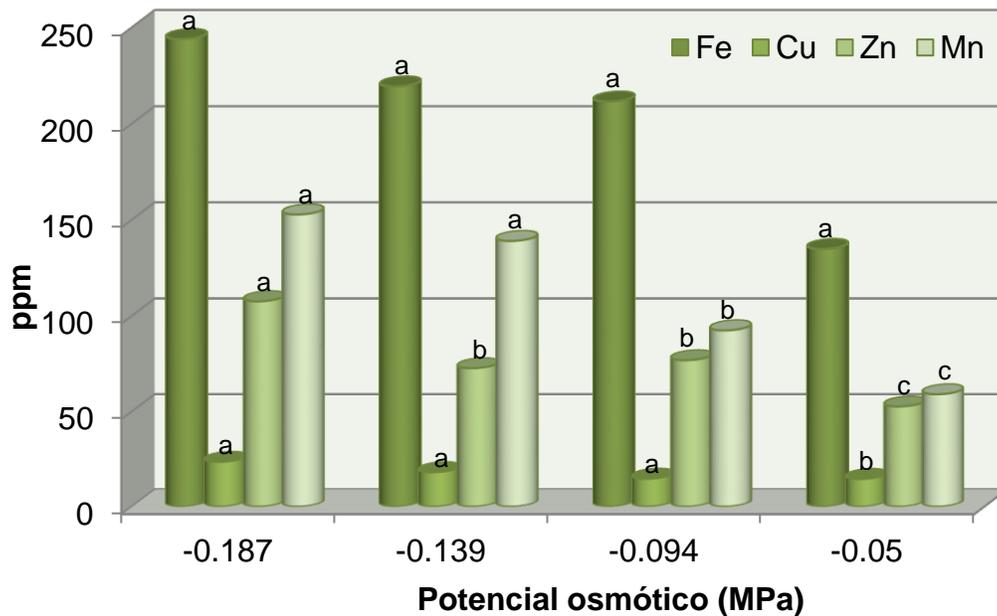


Figura 13. Efecto del potencial osmótico del medio de cultivo Murashige y Skoog en el contenido de Fe, Cu, Zn y Mn, en brotes de *Agave potatorum* Zucc. cultivados *in vitro*.

6.2.5 Extracción nutrimental en brotes de *A. potatorum* Zucc. cultivados *in vitro* en dependencia del potencial osmótico del medio de cultivo.

La extracción nutrimental es la relación que existe entre la cantidad de nutrimentos absorbidos y la producción de materia seca. Este parámetro es usado para conocer el contenido relativo de los nutrimentos en *in vitro* plantas, en el presente estudio *A. potatorum* Zucc.

La absorción nutrimental depende principalmente de la disponibilidad de los nutrimentos, del tamaño de la planta, follaje, cultivar, estado fenológico, condiciones ambientales en las que se desarrolla la planta, entre otros. Todos estos factores tienen un efecto en la absorción de agua y nutrimentos y es posible evaluarla mediante el rendimiento, calificado como alto o bajo (Adams, 2004).

Tomando en consideración los valores de la materia seca acumulada (PMS) (Cuadro 5) y el contenido nutrimental (CN), de macro y micronutrientes (Cuadros 6, 7 y 8), se calculó la extracción nutrimental (EN) por los brotes cultivados *in vitro* de la especie en estudio. Los valores de la EN se presentan en el Cuadro 9. El análisis estadístico mostró que existieron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los tratamientos, debidas al potencial osmótico del medio.

Cuadro 9. Efecto del potencial osmótico del medio (Murashige-Skoog) en la extracción nutrimental de brotes de *Agave potatorum* Zucc. cultivados *in vitro*.

PO	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
MPa	----- $\mu\text{g brote}^{-1}$ -----								
-0.187	9458.5a	692.4a	18356a	1368.9a	719.2a	81.2a	7.51a	36.9a	53.6a
-0.139	8147.6a	529.5b	7076b	997.0b	592.2a	68.3ab	5.48ab	22.9b	44.8a
-0.094	4955.6b	404.7bc	5219bc	852.1bc	396.9b	54.2b	4.10ab	20.1bc	27.1b
-0.050	3130.0b	281.2c	2632c	575.8c	267.7b	33.7c	3.82b	13.3c	15.2c*
DMS	1996.9	131.75	3581.7	286.49	140.5	16.44	3.65	7.86	11.23
CV	56.67	50.36	78.47	55.36	51.84	50.49	12.38	61.26	58.17

PO = potencial osmótico, MPa=megapascales. *Medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha=0.05$). DMS=diferencia mínima significativa. CV=coeficiente de variación.

La mayor EN media de N, Mg y Mn se obtuvo por efecto de los potenciales osmóticos -0.187 y -0.139 MPa, de acuerdo a la comparación múltiple de medias (Tukey $\alpha=0.05$).

En contraste, la menor EN media fue generada por los potenciales osmóticos de -0.094 y -0.050 MPa. La comparación de medias indicó la EN de N y Mg fue similar con ambos potenciales. Además, se observó una reducción significativa del 66.9 y 62.8 %, respectivamente, respecto al potencial osmóticos de -0.187 MPa.

La mayor EN promedio de P, K y Ca (692.4 $\mu\text{g brote}^{-1}$, 18356 $\mu\text{g brote}^{-1}$ y 1368.9 $\mu\text{g brote}^{-1}$, respectivamente) se presentaron por efecto del potencial osmótico menor (-0.187 MPa); en oposición, la EN menor (281.2 $\mu\text{g brote}^{-1}$, 2632 $\mu\text{g brote}^{-1}$ y 575.8 $\mu\text{g brote}^{-1}$, respectivamente) de los tres elementos fue resultado del potencial osmótico

mayor. Aún a lo anterior representó una reducción significativa del 59.4 % para P, 85.7 % para K y 57.9 % para Ca. En general, la EN mayor de N, P, K, Ca y Mg se obtuvo por el efecto del potencial osmótico menor (-0.187 MPa) y conforme el PO aumentó la EN disminuyó. Así, puede asegurarse que entre estas dos variables también existió una relación inversa.

En general, la mayor EN de N, P, K, Ca y Mg se obtuvo por el efecto del potencial osmótico menor (-0.187 MPa) y disminuyó con el aumento del potencial; es decir, existió una relación inversa entre las dos variables. La EN en orden decreciente fue $K > N > Ca > Mg > P$ (Figura 14).

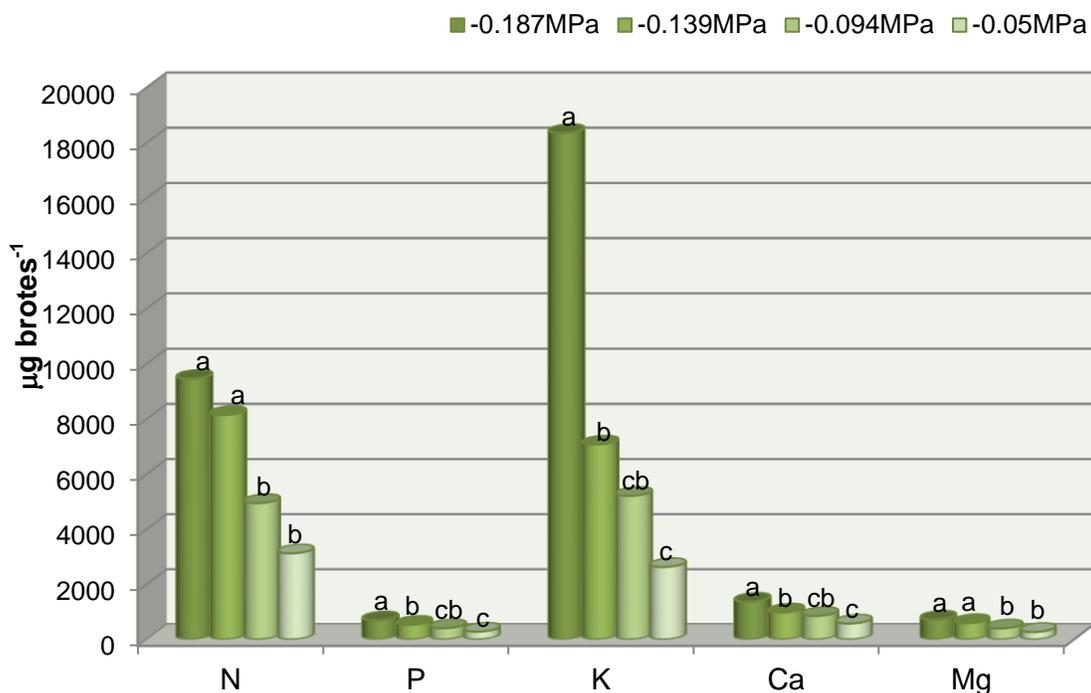


Figura 14. Extracción de N, P, K, Ca y Mg por brotes de *Agave potatorum* Zucc. cultivados *in vitro* en diferentes potenciales osmóticos del medio de cultivo Murashige-Skoog.

Considerando los cuatro niveles de potencial osmótico evaluados, los resultados obtenidos presentan diferencias significativas en la EN de los micronutrientes. La mayor EN se llevó a cabo en el medio con el potencial osmótico menor (-0.187 MPa).

También se observó una reducción significativa en la menor EN obtenida con el potencial osmótico mayor (-0.036 MPa).

Se observan las diferencias significativas en la EN de los cuatro micronutrientes por efecto del potencial osmótico. En promedio, la mayor EN alcanzó valores de 81.2 $\mu\text{g brote}^{-1}$, 7.51 $\mu\text{g brote}^{-1}$, 36.9 $\mu\text{g brote}^{-1}$ y 53.6 $\mu\text{g brote}^{-1}$ para Fe, Cu, Zn y Mn, respectivamente, y fue generada en el tratamiento con el 100 % de solutos del medio MS (Cuadro 9).

En promedio los valores de EN para Fe, Cu, Zn y Mn donde el medio con potencial osmótico mayor (-0.050 MPa) resultaron significativamente mayores que con el potencial menor PO (-0.187 MPa) y la reducción representó el 58.4, 49.13, 64.0 y 71.6 %, respectivamente.

En la Figura 15 se muestra ese efecto, la mayor EN de los micronutrientes se obtuvo por el efecto del potencial osmótico menor (-0.187 MPa) y conforme éste aumentó la EN disminuyó. Así, fue evidente la relación inversa entre ambas variables, potencial osmótico del medio y la EN. La EN en orden decreciente fue Fe>Mn>Zn>Cu.

En resumen, el medio MS con 100 % de solutos generó el menor potencial osmótico (-0.187 MPa), el que mostró un efecto positivo en la mayor absorción de agua y nutrientes; pues, propició la acumulación máxima de materia seca y como resultado de la combinación de las variables PMS y CN generó una mayor extracción nutricional por los brotes de *A. potatozum* Zucc.

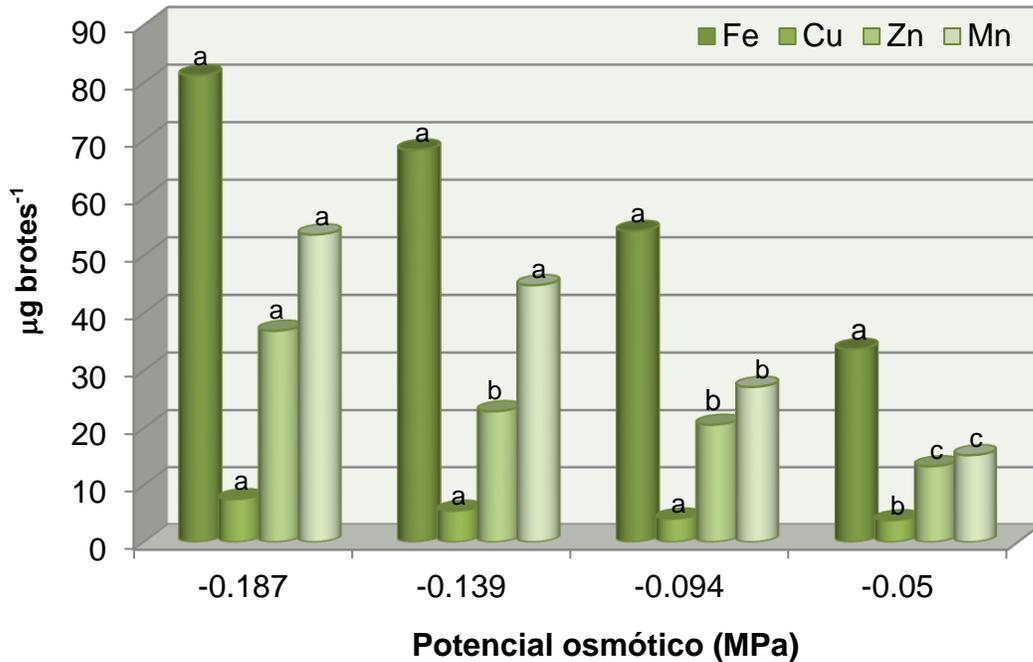


Figura 15. Extracción de Fe, Cu, Zn y Mn por brotes de *Agave potatorum* Zucc. cultivados *in vitro* en dependencia del potencial osmótico del medio de cultivo Murashige-Skoog.

6.3 Correlaciones entre variables

Infante y Zárate (1998) indican que la correlación es una medida de la asociación entre dos variables, el coeficiente de correlación presenta las siguientes propiedades:

1. Toma valores exclusivamente entre -1 y 1.
2. Si el valor es positivo, indica que las variables tienden a crecer o decrecer simultáneamente.
3. Si el valor es negativo, indica que una variable aumenta cuando la otra disminuye.
4. Es una medida adimensional.

Para la identificación de las interacciones significativas entre los nutrientes analizados en los brotes de *A. potatorum* Zucc., se estimaron los coeficientes de correlación de Pearson. Los coeficientes positivos indicaron las relaciones

sinérgicas, mientras que los coeficientes negativos indicaron las relaciones antagónicas. El Cuadro 10 muestra los coeficientes de correlación entre los nutrientes evaluados en el presente estudio.

Cuadro 10. Coeficientes de correlación de Pearson entre los elementos representantes en la absorción nutrimental en el cultivo *in vitro* de *Agave potatorum* Zucc.

	PMS	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
PO	0.185	0.0681	-0.048	-0.044	-0.041	-0.122	0.146	0.051	-0.051	-0.096
	0.012	0.363	0.519	0.557	0.584	0.103	0.050	0.496	0.495	0.199
%H ₂ O	-0.333	-0.242	-0.706	-0.493	-0.688	-0.426	-0.580	-0.445	-0.167	-0.499
	<.0001*	0.0011	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.025	<.0001*
PMS	1	0.087	0.230	0.137	0.194	0.140	0.194	0.138	-0.032	0.097
		0.2446	0.0019	0.068	0.0091	0.062	0.0089	0.065	0.673	0.196
N		1	-0.097	-0.246	0.111	-0.031	-0.039	-0.241	-0.080	-0.080
			0.196	0.0009	0.135	0.675	0.603	0.0011	0.288	0.289
P			1	0.524	0.474	0.343	0.526	0.441	0.135	0.445
				<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.071	<.0001*
K				1	0.496	0.649	0.672	0.789	0.247	0.643
					<.0001*	<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.0008	<.0001*
Ca					1	0.571	0.488	0.396	0.088	0.649
						<.0001*	<.0001*	<.0001*	0.24	<.0001*
Mg						1	0.631	0.497	0.241	0.631
							<.0001*	<.0001*	0.0011	<.0001*
Fe							1	0.603	0.299	0.562
								<.0001*	<.0001*	<.0001*
Cu								1	0.320	0.633
									<.0001*	<.0001*
Zn									1	0.242
										0.001
Mn										1

*Con diferencia significativa; PMS: porcentaje de materia seca; PO: potencial osmótico del medio.

Por considerarse de mayor trascendencia a continuación son analizadas las correlaciones que resultaron significativas:

1. El contenido de humedad (H₂O) se correlacionó negativamente con todos los nutrientes, excepto con N y Zn. Las correlaciones del contenido de humedad con P, K, Ca, Mg, Fe, Cu y Mn, alcanzó valores de 33.3, 70.6, 49.3, 68.8, 42.6, 58.0, 44.5 y 49.9 %, respectivamente.
2. El P se correlacionó positivamente con K, Ca, Mg, Fe, Cu y Mn, en un 54.2, 47.4, 34.3, 52.6, 44.1 y 44.5 %, respectivamente.

3. El K se correlacionó positivamente con Ca, Mg, Fe, Cu y Mn, en un 49.6, 64.9, 67.2, 78.9 y 64.3 %, respectivamente.
4. El Ca se correlacionó positivamente con Mg, Fe, Cu y Mn en un 57.1, 48.8, 39.6 y 64.9 %, respectivamente.
5. El Mg se correlacionó positivamente con Fe, Cu y Mn en un 63.1, 49.7 y 63.1 %, respectivamente.
6. El Fe se correlacionó positivamente con Cu, Zn y Mn en un 60.3, 29.9 y 56.2 %, respectivamente.
7. El Cu se correlacionó positivamente con Zn y Mn en un 32.0 y 63.3 %, respectivamente.

En el Cuadro 11, se presentan las interacciones en la extracción nutrimental por los brotes de *A. potatozum* Zucc. El análisis del efecto del potencial osmótico del medio con la extracción nutrimental mostró algunas de las relaciones sinérgicas y antagónicas altamente significativas. Entre ellas están las siguientes:

1. El potencial osmótico se correlacionó negativamente con la EN de todos los nutrientes; además, la correlación fue altamente significativa sólo con la EN de N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn y Mn, en un 63.3, 53.4, 63.0, 46.7, 55.3, 50.8, 50.6 y 57.2 %, respectivamente.
2. Mientras que la EN del N se correlacionó positivamente con la EN de P, K, Ca, Mg, Fe, Zn y Mn, en un 71.0, 67.9, 69.7, 75.0, 66.8, 67.3 y 75.0%, respectivamente.
3. La EN del P se correlacionó positivamente con la EN de K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mn en un 75.2, 86.4, 89.2, 87.1, 31.6, 89.4 y 83.4 %, respectivamente.
4. La EN del K se correlacionó positivamente con la EN de Ca, Fe, Zn y Mn en un 78.4, 75.9, 68.7, 82.2 y 76.3 %, respectivamente.
5. La EN del Ca correlacionó positivamente con la EN de Mg, Fe, Cu, Zn y Mn en un 89.4, 79.9, 34.3, 89.3 y 89.7 %, respectivamente.
6. La EN del Mg se correlacionó positivamente con la EN de Fe, Zn y Mn en un 82.9, 85.2 y 94.3 %, respectivamente.

7. La EN del Fe se correlacionó positivamente con la EN de Cu, Zn y Mn, en un 44.2, 88.4 y 82.1%, respectivamente,
8. La EN del Zn correlacionó positivamente con la EN de Cu en un 81.8 %.

Cuadro 11. Coeficientes de correlación de Pearson entre la extracción nutrimental por brotes de *Agave potatorum* Zucc. cultivados *in vitro*, en medio con diferente potencial osmótico (PO).

	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn
PO	-0.633 <.0001	-0.534 <.0001	-0.630 <.0001	-0.467 <.0001	-0.553 <.0001	-0.508 <.0001	-0.208 0.0051	-0.506 <.0001	-0.572 <.0001
N	1	0.710 <.0001	0.679 <.0001	0.697 <.0001	0.750 <.0001	0.668 <.0001	0.220 0.0029	0.673 <.0001	0.750 <.0001
P		1	0.752 <.0001	0.864 <.0001	0.892 <.0001	0.871 <.0001	0.316 <.0001	0.894 <.0001	0.834 <.0001
K			1	0.784 <.0001	0.759 <.0001	0.687 <.0001	0.215 0.0037	0.822 <.0001	0.763 <.0001
Ca				1	0.894 <.0001	0.799 <.0001	0.343 <.0001	0.893 <.0001	0.897 <.0001
Mg					1	0.829 <.0001	0.366 0.0087	0.852 <.0001	0.943 <.0001
Fe						1	0.442 <.0001	0.884 <.0001	0.821 <.0001
Cu							1	0.379 0.0034	0.291 0.127
Zn								1	0.818 <.0001
Mn									1

*Con diferencia significativa; PMS: porcentaje de materia seca; PO: potencial osmótico del medio.

Blanco *et al.* (2006) identificaron interacciones significativas entre nutrimentos de plantas de un año de *Opuntia ficus-indica* L. Miller y concluyeron que el rendimiento del nopal depende significativamente de las concentraciones de N, K y Mg.

VII. CONCLUSIONES

- 7.1 Se encontraron diferencias estadísticas significativas (Tukey $\alpha=0.05$) para el contenido de humedad (% H₂O) y peso de materia seca (PMS) en explantes de *Agave potatorum* Zucc., desarrollado con diferente potencial osmótico. Los tratamientos con PO -0.0187 MPa, -0.139 MPa y -0.094 MPa fueron estadísticamente iguales, pero significativamente mayores 3.3% y 16.5% para % H₂O y PMS, respectivamente, en comparación con el tratamiento con el 25% del medio MS (PO = -0.050 MPa).
- 7.2. El tratamiento con el PO de -0.187 MPa concentró mayores niveles de N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Cu en el tejido de explantes de *Agave potatorum* Zucc., en comparación con los demás tratamientos.
- 7.3. La mayor extracción nutrimental de N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Cu en explantes de *Agave potatorum* Zucc., se obtuvo por efecto del menor PO (-0.187 MPa).

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, P. 2004. Aspectos de la nutrición mineral en cultivos sin suelo en relación al suelo. In: Tratado de cultivo sin suelo. Ed. Urrestarazu, G. M. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. 914p.
- Aguirre, D. X. 2004. Genética de poblaciones de *Agave cupreata* y *Agave potatorum*: aportaciones para el manejo y la conservación de especies mezcaleras. Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. 77p.
- http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/biblioteca/ArtsLab/Aguirre_2004.pdf
- Alcántar, G. G., Sandoval, V. M. 1999. Manual de Análisis Químico de Tejido Vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación especial No.10 de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A.C., Chapingo. México. 156p.
- Alcántar, G. G., Trejo-Téllez, L. I., Fernández, P.L. y Rodríguez. M.M.N. 2007. Nutrición de cultivos. In Alcántar, G. G., Trejo-Téllez (eds). Editorial Mundi-Prensa. México. 454p.
- Bautista, C.M.T. 2010. Potencial osmótico en la absorción nutrimental y calidad de fruto en chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.). Tesis Maestra en Ciencias. Edafología. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. 54p.
- Benton, J.J., Benjamin, W., Harry, A.M. 1991. Plant Analysis Handbook. A practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide. Micro-Macro Publishing, Inc. USA. 213p.
- Beltrán-Nambo, M.A., Carreón-Abud, Y. and Ortega, L.M.P. 2010. Mycorrhizal Colonization Patterns of Three *Bletia* Species in a Natural Forest Reserve in Michoacán, Mexico. Acta Hort. 878:43-52.
- Binh, L.T., Muoi, L.T., Oanh. H.T.K., Thang, T.D. and Phong, D.T. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 23:67-70.

- Blanco, M.F., Lara, H.A., Valdez, C.R.D., Cortés, B.J.O., Luna, F.M. y Salas, L.M.A. 2006. Interacciones nutrimentales y normas de la técnica de nutrimento compuesto en nopal (*Opuntia ficus-indica* L. Miller). Revista Chapingo. Serie Horticultura. 12(002):165-175.
- Calderón, P. N. 1995. Efecto de la salinidad en la producción de materia seca y absorción nutrimental de plantas micropropagadas de nopal (*Opuntia* spp.). Tesis Ingeniero Forestal con Orientación en Silvicultura. División de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma Chapingo. 96p.
- Cárdenas, L.M.A. y Villegas M.A. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. revista Fitotecnia Mexicana. 25(2):213-217.
- Casierra-Posada, F., Rodríguez, S. Y. 2006. Tolerance of pineapple guava plants (*Acca sellowiana*) to NaCl salinity. Agronomía colombiana. 24:258-265.
- Cruz, C., Del Castillo, L. Robert, M. y Ordanza, R. N. 1985. Biología y aprovechamiento integral del henequén y otros agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. 297p.
- Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. 1993. Micropropagation Technology and Application. Klumer Academic Publishers. Netherlands. 418 p.
- Devlin, R.M. 1980. Fisiología vegetal. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona. España. 515p.
- Domínguez, R.M.S., Ángel G. Alpuche Solís, Nora L. Vasco Méndez y Eugenio Pérez Molphe Balch. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. Revista Fitotecnia Mexicana. 31(4):317-332.
- Enríquez, V.J.R., Díaz, R.B. 1994. Experiencias obre propagación *in vitro* de plantas. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca. Serie de Cuadernos de los Centros, No.1. Oaxaca.
- Enríquez-del-Valle. J.R., Carrillo-Castañeda, G., Rodríguez-de-la-O, J.L. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. Revista Fitotecnia Mexicana. 28:175-178.

- Enríquez, V.J.R. 2008. La propagación y crecimiento de agaves. Fundación Produce Oaxaca, A.C. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Oaxaca, México. 46p.
- Enríquez, V.J.R., Carrillo, C.G., Sánchez, G.P., Rodríguez, M.M.N., Mendoza, C.M.C. 2000. Fertilización para la óptima adaptación y vigor de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) obtenidas *in vitro*. Revista Fitotecnia Mexicana. 23:59-68.
- Espinosa, P. H., Arredondo, V.C., Cano, G. M. A., Canseco, L.A.M., Vásquez, Q.F. 2002. La materia prima para producir el mezcal oaxaqueño, catálogo de la diversidad de agaves. INIFAP. Folleto Técnico No. 2. Santo Domingo Barrio Bajo, Etlá, Oaxaca. 68p.
- Fundación Produce Oaxaca, A.C. 2005. AGROproduce. Año 1. Número 2. Oaxaca. 36p.
- García-Mendoza, A.J. 2004. Agavaceae. En : García-Mendoza, A. J., Ordoñez, M. J., Briones-Salas (eds.). M. Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM, Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza World Wildlife Fundation, México.
- García-Mendoza, A. J. y Galván R. V. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 56: 7-24.
- Gentry, H. S. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press. Tucson. Arizona. U.S.A. 670p.
- George, E.F. 1993. Osmotic Effect of Media Ingredients. En Plant Propagation by tissue Culture. Part 1. The Technology. Exergetics. Edington, Wilts, Inglaterra. 327-338 p.
- Gil, M. F. 1995. Elementos de fisiología vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. España. 1147p.
- González, R.H. y Manzo, G. A. 2008. Manual de técnicas selectas de cultivo de tejidos vegetales. Manual didáctico No. 8. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 155p.
- Granados, S. D. 1993. Los agaves en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo. México. 252p.

- Hartmann, H. T. y Kester, D.E. 1994. Propagación de plantas. 2ª Edición. Editorial C.E.C.S.A. México. 760p.
- Hernández, O.F. y Reyes, S.M.L. 2007. Métodos alternativos para la extracción de miel de agave y su caracterización nutricional. Tesis Ingeniero Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. 48p.
- Huber, S.C. 1985. Role of potassium in photosynthesis and respiration. En R.D. Munson (Ed.) Potassium in Agriculture. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Madison, WI. 369-391p.
- Hurtado, M.D. y Merino, M.M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Editorial Trillas. México. 232p.
- Hopkins, W.G. 1999. Introduction to Plant Physiology. 2th Edition. John Wiley & Sons, Inc. U.S.A. 512p.
- Hazra, K.S., Das, S, Das, K.S. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 70:235-240.
- Infante, G.S. y Zárate, L.G. 1998. Métodos estadísticos: un enfoque interdisciplinario. 2ª Edición. Editorial Trillas. México. 643p.
- Jose, M. C. 2006. Hidrólisis de inulina del *Agave potatorum* Zucc. durante el cocimiento en un horno tradicional y condiciones saturadas. Tesis Profesional. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Xoxocotlán, Oaxaca. 87p.
- Lambers, H., Chapin, F.S. and Pons, T.L. 1998. Plant Physiological Ecology. Springer. USA. 540p.
- Lara-Cárdenas, M.A., A. Villegas-Monter. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. Revista Fitotecnia Mexicana. 25(2) :213-217.
- Loneragan, J.F. and Asher, C.J. 1982. Response of plants to phosphate concentration in solution culture : II rate of phosphate absorption and relation to growth. Soil Science. 103 :311-318.
- López, P.C. 1990. Medios de cultivo. In Rosell, C.H. y Villalobos A.V.M. (eds.). Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Ed. FAO. Roma, Italia. 15-16p.

- Madrigal-Lugo, R., Pineda-Estrada, F. y Rodríguez de la O, J.L. 1990. Agave. In : Ammirato P. V., Evans, D.A., Sharp, W.R. and Bajaj, Y.P.S. (eds.). Handbook of Plant Cell Culture. Ornamental Species. McGraw Hill Public. Co. New York, U.S.A. 5 :206-227.
- Magdaleno-Villar, J.J., A. Peña-Lomelí, R. Castro-Brindis, A.M. Castillo-González, A. Galvis-Espíndola, F. Ramírez-Pérez y B. Hernández-Hernández. 2006. Efecto de soluciones nutritivas sobre el desarrollo de plántulas de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). Revista Chapingo. Serie Horticultura. 12(2):223-229.
- Malavolta, E. 1986. Nutrição, adubação e colagem para o cafeeiro. Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade. Associação Brasileira para lá investigassem del fósforo y potássio. São Paulo, Brasil.
- Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Ed. Academic Press. London. 673p.
- Martínez, A. N. 2006. Análisis de crecimiento y dinámica nutrimental del chile poblano (*Capsicum annum* L. var *Grossum sendt*), en cuatro soluciones nutritivas bajo invernadero. Tesis Maestro en Ciencias en Horticultura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 90p.
- Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M.P., Chávez, M.V. and Bye, R. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. Plant Cell, Tissue Organ Culture. 74:135-142.
- Martínez, R.M. 2004. Aclimatación y enraizamiento in situ de agaves (*Agave duranguensis* Gentry y *Agave potatorum* Zucc.) obtenidos *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 102p.
- Medrano, H., J. Bota, J. Cifre, J. Flexas, M.R. Carbó y J Guías. 2007. Eficiencia del uso del agua por las plantas. Instituto Universitario de Geografía. Universidad de Alicante. Investigaciones Geográficas. 43 :63-84.
- Mengel, K. and Kirkby, E.A.. 1987. Principles of Plant Nutrition. 4th ed. International Potash Institute. Berna, Suiza. 687 p.

- Molinos, S.C., A. Villegas M., P. Sánchez G., G. Alcántar G., M. N. Rodríguez M. y L.M. Ruiz P. 2004. Efecto del potencial osmótico y contenido de Ca en el medio de cultivo sobre la distribución de Ca^{2+} y K^+ , producción de biomasa y necrosis apical de vid "R110." *Interciencia*. 29(7):384-388.
- Morard P. and Henry, M. 1998. Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. *Journal of Plant Nutrition*. 21 :1565-1576.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum*. 15: 473-493.
- Nava, C. A. 1988. *Agave tequilana* Weber "Azul" *in vitro*: un modelo para estudios en morfogénesis. Tesis Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. 160p.
- Nikam, D.T. 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 51:225-228.
- Nobel, P.S. 1998. Los incomparables agaves y cactus. Editorial Trillas. México. 211p.
- Pacheco, N. 2006. Industrializadora Integral del Agave S.A. de C.V. Características general. En línea: www.naturel.com.mx/aserca.html
- Parker, R. 2000. La ciencia de las plantas. Paraninfo. Madrid. España.
- Parra, T. S., Baca-Castillo, G.A., Tirado, T.J.L., Villareal, R.M., Sánchez, P.P. y Hernández. V.S. 2009. Calidad del fruto, composición y distribución de elementos minerales en pepino en respuesta a silicio y al potencial osmótico de la solución nutritiva. *Terra Latinoamericana*. Universidad Autónoma Chapingo. 27: 123-131.
- Pierik, R.L.M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. 326p.
- Pierik, R.L. and Steegmans, H.H.M. 1975. Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of rhododendron. *Scientia Horticult*. 3: 1-20.
- Powers, D.E, and Backhaus, R.A. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 16:57-60.
- Ramage, C.M. and Williams, R.R. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cell. Dev.. Biol.-Plant*. 38:116-224.

- Ramirez, M.M., Trejo-Téllez, L.I., Gómez, M.F.C. y Sánchez, G.P. 2010. La relación K^+/Ca^{2+} de la solución nutritiva afecta el crecimiento y calidad postcosecha del tulipán. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 33(22): 149-156.
- Raya, M.Y.A., Villegas, M.A. y Arellano, O.G. 2009. Cinética de enraizamiento *in vitro* de portainjertos de vid en respuesta a la fuente y concentración de azúcar. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 32(2):111-117.
- Resh, M.H. 2001. Cultivos hidropónicos. 5ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. 558p.
- Robert, M.L., Herrera, J.L., Contreras, F. and Scorer, K.N. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 8:37-48.
- Rodríguez, M.M.N., Trejo-Téllez, L.I. y Alcántar, G.G. 2007. Nutrición de cultivos. In Alcántar, G. G. y Trejo-Téllez, L.I. (eds). Editorial Mundi-Prensa. México. 454p.
- Rojas, V. A. N. 2010. Cultivo hidropónico y manejo nutrimental de la producción anual de *Antirrhinum majus* L. en condiciones de invernadero. Tesis Doctor en Ciencias. Programa de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados. 74p.
- Salisbury, F. B., Ross, C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo Editorial Iberoamérica. México. 759p.
- Sánchez, L. A. 1989. Oaxaca tierra de maguey y mezcal. Instituto Tecnológico de Oaxaca. México. 35p.
- Santacruz-Rubalcava, F., Gutiérrez-Pulido, H. and Rodríguez-Garay, B. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 56:163-167.
- Silos-Espino, H., González-Cortés, H., Carrillo-López, A., Guevara-Lara, F., Valverde-González, M.E. and Paredes-López, O. 2007. Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* "Gentry". *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 82:355-359.
- Sinha, R.K. 2004. *Modern Plant Physiology*. Alpha Science International Ltd. Pangbourne, Uk. 620p.

- Sonneveld, C., Van den Boss, A.L. 1995. Effects of nutrients level on growth and quality of radish (*Raphanus sativus* L.) grown on different substrate. *Journal of Plant Nutrition*. 18:501-513.
- Sumano, G. L. 2005. Producción de plántulas de maguey tobalá (*Agave potatorum* Zucc.) en Sola de Vega, Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 50p.
- Taiz, L. and Zeiger, E. 1998. *Plant physiology*. 2th ed. Sinauer Associates Inc. Publishers. Massachusetts. U.S.A. 792p.
- Tisdale, S.L., Nelson, W.L., Beaton, J.D. and Havlin, J.L. 1993. *Soil fertility and fertilizers*. 5th ed. Mac Millan Publishing. New York. USA. 634p.
- Torres, M.M.I., Morales, R.M.M., Santacruz, R.F. y Rodríguez, G.A. 2006. Micropropagación por organogénesis *in vitro* de *Agave tequilana* Weber variedad Azul. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. México. 89p.
- Urrestarazu, G.M. 2004. *Tratado de cultivo sin suelo*. 3^a Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. 914p.
- Varela, R. 2006. SAGARPA, apuesta por diversificar usos del agave. *El Financiero*, México, D.F. Jul.27:20.
- Velázquez, M.J. 2008. Extracción nutrimental en lisianthus (*Eustoma grandiflorum* Raf. cv. mariachi). Tesis de Licenciatura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 102p.
- Valenzuela-Sánchez, K.K., Juárez-Hernández, R.E., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M.E. and Paredes-López, O. 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In vitro Cell. Dev. Boil. Plant* 42:336-340.
- Valenzuela, Z.A.G. 2007. Las denominaciones de origen tequila y mezcal y la biodiversidad en el género Agave. En línea:
<http://www.rimisp.org/FCKeditor/UserFiles/File/documentos/docs/pdf/DTR-IC/lasdenominacionesdeorigentequilaymezcal.pdf>

- Valenzuela, Z. A. y Sánchez, A. 1985. Revisión Taxonómica del género *Agave* en el Estado de Oaxaca. En: Plan de Desarrollo de la Agroindustria del Estado de Oaxaca. Instituto Tecnológico de Oaxaca. CONACyT. Oaxaca, México.
- Vargas, C. J.M. 2008. Dinámica de extracción de macronutrientes en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en hidroponía bajo invernadero. Tesis de Licenciatura. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 82p.
- Villegas-Torres, O.G., Sánchez-García, P., Baca-Castillo, G.A., Rodríguez-Mendoza, M.N. Trejo, C., Sandoval-Villa, M. y Cárdenas-Soriano, E. 2005. Crecimiento y estado nutrimental de plántulas de tomate en soluciones nutritivas con diferente concentración de calcio y potencial osmótico. *Terra Latinoamericana*. Universidad Autónoma Chapingo. 23(1): 49-53.