

# **UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISIÓN DE CIENCIAS AGRONÓMICAS  
COORDINACIÓN DE POSTGRADO**



**EVALUACIÓN DE DIFERENTES FUENTES Y NIVELES DE  
NITRÓGENO Y CALCIO EN PLANTAS DE *Agave tequilana*  
WEBER VARIEDAD AZUL, *in vitro* Y EN INVERNADERO**

**Martha Isabel Torres Morán**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS Y FORESTALES**

**ZAPOPAN, JALISCO. ABRIL 2005**

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS  
DIVISION DE CIENCIAS AGRONOMICAS  
COORDINACION DE POSTGRADO



Esta tesis titulada "Evaluación de diferentes fuentes y niveles de nitrógeno y calcio en plantas de *Agave tequilana* Weber variedad azul, *in vitro* y en invernadero", fue realizada bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención de grado de:

## MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS Y FORESTALES

### CONSEJO PARTICULAR:

Tutor:

Dr. Mario Abel García Vázquez

Asesor:

Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba

Asesor:

M.C. Ricardo Nuño Romero

Asesor:

M.C. Salvador Antonio Hurtado de la Peña

Asesor:

Dr. Juan Francisco Casas Salas

Las Agujas, Mpio. ZAPOPAN, Jal., 20 de Abril de 2005

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que intervinieron para que este proceso llegara a buen fin. Sería injusto mencionar solo a algunas.

Sin embargo, quiero hacer patente mi agradecimiento a mis padres y cada uno de los miembros de mi familia, a los amigos de ahora y siempre, profesores y compañeros de trabajo cuyo apoyo, instrucción, comprensión y palabras de aliento, fueron y siguen siendo fundamentales para mi desarrollo personal, espiritual y profesional.

## CONTENIDO

LISTA DE CUADROS .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	ii
RESUMEN .....	iv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. HIPÓTESIS .....	3
3. OBJETIVOS .....	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
4.1 Morfogénesis .....	5
4.1.1 Organogénesis directa .....	6
4.1.2 Organogénesis indirecta .....	7
4.1.3 Yemas adventicias y yemas axilares .....	8
4.1.4 Embiogénesis directa e indirecta .....	8
4.2 Métodos de micropropagación .....	9
4.3 Variación somaclonal .....	10
4.4 Medio de cultivo para la micropropagación o cultivo <i>in vitro</i> .....	10
4.4.1 Elementos minerales .....	11
4.4.2 pH .....	13
4.4.3 Potencial osmótico .....	13
4.4.4 Reguladores de crecimiento .....	14
4.4.5 Agentes gelificantes .....	14
4.5 Micropropagación del género <i>Agave</i> spp .....	15
4.6 Variabilidad genética asexual .....	17
4.7 Influencia del nitrógeno en los cultivos <i>in vitro</i> .....	18
4.8 Influencia del calcio en los cultivos <i>in vitro</i> .....	21

4.9 Adaptación de las plantas propagadas por cultivo <i>in vitro</i> .....	23
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
5.1 Selección del explante y preparación del material .....	27
5.2 Registro de la producción de brotes .....	28
5.3 Establecimiento del experimento <i>in vitro</i> .....	29
5.4 Adaptación a condiciones de invernadero .....	31
5.5 Análisis estadístico .....	32
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>34</b>
6.1 Selección de los clones para el experimento <i>in vitro</i> .....	34
6.2 Análisis de varianza de las variables de la etapa <i>in vitro</i> .....	36
6.2.1 Análisis de varianza y DMS para la variable número de brotes	39
6.2.2 Contrastes ortogonales para la variable <u>número de brotes</u> .....	40
6.2.3 Análisis de varianza para la variable <u>tamaño de brotes</u> .....	42
6.2.4 Contrastes ortogonales para la variable <u>tamaño de brotes</u> .....	42
6.2.5 Análisis de varianza para la variable <u>origen de los brotes</u> .....	43
6.2.6 Contrastes ortogonales para la variable <u>origen de los brotes</u> ...	43
6.2.7 Análisis de varianza para la variable <u>producción de callo</u> .....	45
6.2.8 Contrastes ortogonales para la variable <u>producción de callo</u> ...	45
6.3 Análisis de la superficie de respuesta .....	47
6.3.1 Ajuste de los modelos en la variable <u>número de brotes</u> .....	48
6.3.2 Ajuste de los modelos en la variable <u>tamaño de brotes</u> .....	49
6.3.3 Ajuste de los modelos en la variable <u>origen de los brotes</u> .....	50
6.3.4 Ajuste de los modelos en la variable <u>producción de callo</u> .....	51
6.3.5 Ajuste de los modelos en la variable <u>calidad de los brotes</u> .....	51

6.3.6 Determinación de niveles óptimos de N y Ca para la variable número de brotes .....	52
6.4 Análisis de varianza en las variables de la etapa de invernadero .....	53
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>61</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE CUADROS

No.	NOMBRE	Pág.
1	Composición de sales minerales en los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), SH (Schenk y Hildebrandt, 1971) y B5 (Gamborg, 1976) .....	12
2	Auxinas y Citocininas más frecuentemente utilizadas en el cultivo de tejidos .....	14
3	Tratamientos generados para la superficie de respuesta .....	30
4	Variables a evaluar en la fase <i>in vitro</i> .....	31
5	Análisis de varianza para <u>número de brotes</u> .....	39
6	Promedios y DMS de la variable <u>número de brotes</u> .....	39
7	Prueba de F en los contrastes ortogonales para la variable <u>número de brotes</u> .....	41
8	Análisis de varianza para <u>tamaño de brotes</u> .....	42
9	Prueba de F en los contrastes ortogonales para la variable tamaño de los brotes .....	42
10	Análisis de varianza para organogénesis .....	43
11	Prueba de F en los contrastes ortogonales para la variable origen de los brotes .....	44
12	Análisis de varianza para producción de callo .....	45
13	Prueba de F en los contrastes ortogonales para la variable producción de callo .....	45
14	Modelos de regresión ensayados para el experimento de niveles de N y Ca .....	47
15	Resumen de los modelos de regresión para variables medidas <i>in vitro</i> .....	48

16	Producción total de yemas axilares en dos clones de <i>A. tequilana</i> cultivados en tres medios basales .....	51
17	Dosis óptimas de N y Ca para producción de brotes de dos clones de <i>A. tequilana</i> en dos medios basales .....	52
18	Análisis de varianza para proporción raíz/brote .....	53
19	Prueba de F en los contrastes ortogonales para la variable proporción raíz/brote .....	53
20	Análisis de varianza para porcentaje de adaptación	54
21	Prueba de F en los contrastes ortogonales para la variable porcentaje de adaptación .....	55



## LISTA DE FIGURAS

No.	NOMBRE	Pág.
1	Hijuelos de agave seleccionados en campo para ser usados como explante inicial .....	27
2	Establecimiento <i>in vitro</i> de hijuelos de <i>A. tequilana</i> .....	28
3	Preparación de los brotes .....	30
4	Establecimiento <i>ex vitro</i> .....	31
5	Producción de brotes en 13 hijuelos de <i>A. tequilana</i> .....	34
6	Histograma de frecuencias para la variable producción de brotes en 13 clones de <i>A. tequilana</i> .....	35
7	Representación del comportamiento en producción de brotes de los dos grupos de clones y sus líneas de tendencia a lo largo de 15 meses de cultivo .....	36
8	Prueba de normalidad para la variable número de brotes .....	37
9	Ajuste a la normalidad en la variable raíz de No. de brotes+1 .....	37
10	Número de plantas de <i>A. tequilana</i> del clon A4H3 adaptadas a condiciones <i>ex vitro</i> después de 30 días .....	57
11	Número de plantas de <i>A. tequilana</i> del clon A10H2, adaptadas a condiciones <i>ex vitro</i> después de 30 días .....	57
12	Producción de peso seco en plántulas del clon A4H3 provenientes de cultivo <i>in vitro</i> .....	59
13	Producción de peso seco en plántulas del clon A4H3 provenientes de cultivo <i>in vitro</i> .....	60

## RESUMEN

La producción de tequila representa una importante fuente de recursos económicos para el país y es también una importante fuente de trabajo en nuestro estado. La materia prima para su elaboración, según la Norma Oficial Mexicana, debe ser el *Agave tequilana* Weber variedad azul, determinación que ha marcado una nueva corriente en el cultivo de esta especie y que ha contribuido al aumento de los problemas que se han observado durante el desarrollo de su cultivo.

La atención de los productores e industriales del tequila se ha dirigido hacia plantas de agave tequilero producidas por técnicas de cultivo *in vitro*, ya que de esta manera se tiene una opción de iniciar el cultivo a partir de plantas sanas y de buena calidad. Sin embargo, hasta ahora no es posible acceder a una metodología experimentada y probada para *A. tequilana*.

Para el presente trabajo, se han seleccionado dos elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo del cultivo, tanto *in vitro*, como en la adaptación en invernadero, ya que el objetivo principal de la presente investigación, fue evaluar la respuesta morfogénica y de adaptación de las plantas de *A. tequilana* Weber variedad azul a la aplicación de diferentes niveles de nitrógeno y calcio en el cultivo *in vitro* y en invernadero.

Para la prueba de diferentes niveles de N y Ca, se utilizaron dos clones (grupos de brotes) provenientes de dos hijuelos diferentes establecidos *in vitro* y cultivados en tres diferentes medios basales.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados en las fases de laboratorio e invernadero, permiten concluir que los hijuelos que se establecen *in vitro* para micropropagación, no se comportan de manera uniforme en la producción de brotes ni en la respuesta de las otras variables medidas tanto en laboratorio como en invernadero.

Los clones utilizados respondieron de manera muy diferente al medio de cultivo utilizado en laboratorio y esto a su vez se reflejó en la adaptación de los mismos a condiciones de invernadero.

## 1.INTRODUCCIÓN

La bebida jalisciense más reconocida a nivel mundial, es sin duda el tequila. Después de la aparición de la norma NOM-006 SCFI.1993 que marca los requisitos sanitarios del proceso de elaboración del tequila y de la publicación el 13 de octubre de 1997, en el Diario Oficial de la Federación de la Declaración General de Protección a la Denominación de Origen Tequila (NOM-006-SCFI-1994), la cadena productiva agave – tequila se vio modificada en algunos de sus “eslabones”, teniendo como resultado la modificación en ocasiones casi total, de las prácticas que se realizaban tradicionalmente, tanto en el cultivo como en la elaboración de la bebida; por otra parte, se incrementó la demanda nacional e internacional de la bebida y la aparición de enfermedades en el cultivo propició que se generaran varias líneas de investigación.

Según Roldán (2000), una cuestión que agravó la situación de la industria tequilera es que los estudios científicos en torno a esta bebida no tienen más de 15 años, a diferencia de las industrias del coñac, ron, vodka, brandy o whisky, que tienen una gran solidez gracias a la investigación que han realizado desde hace más de 200 años.

El monocultivo, el mal manejo, el medio ambiente y los años que dura el cultivo de agave, propiciaron la proliferación de los hongos *Fusarium oxysporum* y *Thelaviopsis* spp, causantes de pudrición de la raíz y cogollo, así como la pudrición blanda causada por la bacteria *Erwinia carotovora* (Fucikovsky, 2004). Al coincidir la enfermedad del agave con un aumento en la demanda nacional y mundial de tequila, la industria tequilera reclamó soluciones al problema.

En México, Instituciones como el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ), el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) y el Consejo Regulador del Tequila (CRT), se dieron a la tarea de implementar proyectos tendientes a buscar soluciones.

En su momento la SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) publicó junto con COECyT Jalisco (Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología) que ya existían nuevas técnicas de micropropagación y desarrollo biotecnológico que podían ser utilizadas para la producción del agave tequilero en Jalisco mencionando principalmente la micropropagación que comenzó a realizarse en las instituciones antes mencionadas (COECyT-SAGARPA, 2002).

Las necesidades de la industria tequilera abarcan desde hace algunos años el obtener agaves más fuertes, resistentes a condiciones climáticas adversas, a plagas y enfermedades, una maduración de menor tiempo y con mayor peso de la piña y más inulinas que se transformen en azúcares y luego en alcohol. Asimismo, es necesario reconsiderar todas las etapas en la cadena productiva agave-tequila en busca de soluciones tecnológicas, como selección y mejoramiento de levaduras de fermentación, condiciones de envasado, aprovechamiento de la mayor cantidad de azúcares en la molienda y aprovechamiento del bagazo entre otras.

Por lo anterior, puede decirse que la micropropagación del agave tequilero es una propuesta biotecnológica para la obtención de la materia prima necesaria en la elaboración del tequila, con una calidad fitosanitaria adecuada y en una cantidad razonablemente alta que cubra las necesidades del sector industrial involucrado.

No obstante las investigaciones realizadas, esta biotecnología aún no se utiliza en forma masiva, ni se ha probado su eficiencia apropiadamente debido al ciclo tan largo del cultivo y a que en los últimos años, se han venido presentando obstáculos en las cuestiones técnicas que no habían sido registrados con anterioridad en la bibliografía existente, como son la variación somaclonal, la modificación de las prácticas culturales en la utilización de plantas obtenidas por cultivo de tejidos y la sobre-plantación de agave en la zona protegida por la denominación de origen y también fuera de ésta.

El presente trabajo incide precisamente en el inicio de ésta cadena productiva, ya que aborda la propagación de esta planta en condiciones de laboratorio, así como la adaptación de esas plantas a condiciones de invernadero.

## 2.OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajos son:

- Evaluar la respuesta morfogénica en la producción de plantas *in vitro* de *Agave tequilana* Weber, variedad azul, modificando los niveles de nitrógeno y calcio en el medio de cultivo.
- Evaluar la influencia de los diferentes tipos de medio de cultivo en la adaptación de esas plantas en invernadero.
- Encontrar una combinación óptima de nitrógeno y calcio para mayor obtención de brotes.

### 3.HIPÓTESIS

Las hipótesis a probar en el presente trabajo son:

- El utilizar diferentes niveles de nitrógeno y calcio en los medios de cultivo *in vitro*, promueve brotes bien diferenciados y de calidad en *A. tequilana*.
- El medio de cultivo en el que se propagan plantas de *A. tequilana*, tiene influencia en la cantidad de plantas adaptadas y en el tiempo de adaptación de las mismas en invernadero.

## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Morfogénesis.

La micropropagación o cultivo *in vitro* de especies vegetales, es una técnica desarrollada como extensión de los métodos de propagación vegetativa convencional. Esta es posible gracias a la propiedad totipotente de la célula vegetal. De acuerdo con George (1993), estas técnicas *in vitro* poseen algunas ventajas con respecto a los métodos convencionales, tales como:

- 1.- La posibilidad de iniciar la propagación a partir de un pequeño fragmento de tejido.
- 2.- Desarrollo en condiciones asépticas<sup>1</sup> por lo que las plántulas obtenidas de este modo, no son portadoras de enfermedades
- 3.- Se requiere muy poco espacio para la propagación de grandes cantidades de plantas.
- 4.- La posibilidad de propagación de especies de difícil multiplicación convencional, o especies con semillas recalcitrantes
- 5.- Posibilidad de propagarlas independientemente de la época del año.

Uno de los aspectos a observar en la micropropagación de cualquier especie, es el método que debe utilizarse, pues de ello depende la calidad de la propagación.

El proceso que permite la formación de nuevos tejidos a partir de una o más células vegetales es denominado *Morfogénesis* (George, 1993). La naturaleza de la morfogénesis determina el resultado de la micropropagación, ya que de la manera en que ésta se presente, depende la conservación de las características genéticas del individuo que se propaga, además de que es manipulable gracias a la influencia de elementos como el nitrógeno y los reguladores de crecimiento.

---

<sup>1</sup> Ausencia de microorganismos

La morfogénesis puede presentarse de dos maneras: directa, a partir de células diferenciadas e indirecta a partir de células des-diferenciadas y por lo tanto, no especializadas, que son llamadas "callo".

A continuación se mencionan las principales características de la morfogénesis<sup>2</sup> y su importancia en la propagación *in vitro* tal y como lo menciona George (1993) en su tratado sobre cultivo de tejidos.

#### **4.1.1 Organogénesis directa.**

De acuerdo con lo mencionado por George (1993), se trata de la formación de partes vegetales completas a partir de un tejido dado sin la generación de callo, ejemplo, la formación de brotes, raíz, embriones somáticos y flores. Raras veces se produce la organogénesis directa a partir de un fragmento pequeño de tejido, por lo que es muy importante considerar el tipo de explante<sup>3</sup> inicial y su tamaño.

Muchas especies producen brotes adventicios (por organogénesis) a partir de diferentes explantes, incluyendo aquellos derivados de pecíolos, tallos, raíces, hojas y cotiledones.

Cuando los meristemas se originan de varias células, es posible la aparición de quimeras, algunos investigadores como Broertjes *et al*, citado por George (1993), sostienen que durante la embriogénesis directa, algunos brotes no se generan directamente de las células del tejido del explante, sino que de algunas células de la epidermis se originan primero centros meristemáticos de donde emergen los brotes.

Es necesario hacer estudios histológicos si se quiere determinar el origen exacto de la organogénesis.

Actualmente se han descubierto muchos métodos para inducir organogénesis directa en muchas especies. En la organogénesis directa, el meristemo del brote se origina a partir de la división celular del tejido del explante una vez puesto éste

---

<sup>2</sup> En ocasiones llamada también organogénesis

<sup>3</sup> Parte de la planta que da inicio a un cultivo *in vitro*



en el medio de cultivo *in vitro*. Gracias a la constante división mitótica, se forman primordios meristemáticos a partir de varias células, llamados también meristemoides y estos primordios se convierten posteriormente en células morfogénicamente competentes que se separan posteriormente en forma equidistante. En ocasiones puede observarse claramente que los meristemas se originan a partir de una sola célula, pero el origen exacto es todavía motivo de controversia (Acram *et al*; 2003).

#### **4.1.2 Organogénesis indirecta.**

La posición de los centros meristemáticos puede tener cierta relación con la organización del callo en el explante, pero después de un periodo se forman brotes y raíces dentro del mismo y es un evento que puede ocurrir también de manera exógena. En algunas plantas, los dos tipos de órgano, raíz y brote, aparecen en partes diferentes del tejido, la raíz en las partes superiores y los brotes en las partes pegadas al medio de cultivo. No está claro aún cómo los meristemoides se programan para producir cierta clase de órgano, ya que esto puede ocurrir aún en medio de cultivo no adicionado con reguladores de crecimiento (Butenko, 1968).

El medio de cultivo y la utilización de reguladores de crecimiento, favorecen la des-diferenciación de las células implicadas en el cultivo de tejidos, lo cual se traduce en una rápida producción de callo en un explante, esto en ocasiones, puede retrasar la morfogénesis y la formación de células meristemáticas que dan lugar a brotes y/o raíces. Sin embargo, la organogénesis se presenta inevitablemente en tejidos sometidos a una producción de callo durante periodos prolongados, cuando el callo no es frecuentemente subcultivado.

La aparición de callo, facilita la "reprogramación" de la célula a través de reguladores de crecimiento que estimulan la formación de órganos diferenciados, lo cual constituye la principal ventaja en la micropropagación (Acram *et al*; 2003).

#### **4.1.3 Yemas adventicias y yemas axilares.**

Las yemas adventicias son yemas que se forman durante la organogénesis directa. Éstas pueden no aparecer inmediatamente derivadas de células del explante. En muchas ocasiones, la yema adventicia tiene un origen unicelular, ya que hay evidencias de que células de la epidermis, son competentes para la formación de centros meristemáticos, pero esto en ocasiones es una desventaja, ya que las plantas resultantes, presentan una alta tasa de variación en características fenotípicas y aún genéticas con respecto al explante que les dio origen. Por el contrario, las yemas axilares se encuentran preexistentes en el explante que se utiliza, por ejemplo en fragmentos de tallo y conservan las características de la planta madre a través de su desarrollo en condiciones de cultivo de tejidos (George, 1993).

#### **4.1.4 Embriogénesis directa e indirecta.**

En muchas plantas, además de formarse embriones cigóticos, se forman embriones de manera asexual, a partir de tejido del óvulo, sin fusión de núcleos. Esta formación es llamada apomixis y es el resultado de un buen número de procesos diferentes, que provienen de dos vías: la primera, de células somáticas dentro del saco embrionario, o bien, de una sola célula del tejido nucelar.

Como los embriones somáticos son el resultado de procesos apomícticos, las plantas resultantes de este proceso, son iguales genéticamente a la planta que les dio origen y este hecho puede ser aprovechado en la micropropagación. La desventaja es precisamente la no variabilidad de los individuos resultantes (Butenko, 1968).

*In vitro*, el proceso de formación de un embrión somático sin pasar por callo es más fácilmente observable que *in vivo*, ya que los tejidos derivados del gametofito y los tejidos producidos durante las fases tempranas de la formación del cigoto, es decir inmediatamente después de la fertilización del huevo, son competentes para tal efecto.

Este fenómeno puede ocurrir tanto en la naturaleza, por ejemplo dentro de los óvulos de algunas plantas o más raramente en las hojas; así como *in vitro*. Cuando los embriones son inducidos a partir de células des-diferenciadas (callo) el proceso es denominado *embriogénesis indirecta* (George, 1993).

Los embriones somáticos pueden llegar a reemplazar al embrión cigótico dentro de una semilla, o bien aparecer junto con ellos, como en algunas variedades poliembriónicas del género *Citrus sp.* De manera natural, las semillas de una planta contienen uno o más embriones formados después de la fertilización de una célula huevo que se origina del tejido nucelar. Algunos géneros de plantas, tienen la tendencia a formar más de un embrión en sus semillas. Esto ocurre cuando un cigoto fertilizado o embrión joven se divide en más de una unidad (Acram *et al*; 2003).

#### **4.2 Métodos de micropropagación.**

Los métodos de micropropagación, se dividen dependiendo de la morfogénesis que los origina, atendiendo a las características que se mencionaron en la descripción de la morfogénesis. Dependen directamente del tipo de explante que origina la micropropagación y del manejo que se le da a los tejidos durante el cultivo *in vitro*, dichos métodos son:

- Propagación de plantas por yemas axilares
- Propagación por organogénesis directa
- Propagación por organogénesis indirecta
- Propagación por embriogénesis somática directa
- Propagación por embriogénesis somática indirecta

Cada uno de los métodos, tiene diferente posibilidad de originar variación, que en este caso es llamada *variación somaclonal* y se presenta con mayor frecuencia en los métodos indirectos, ya que parten de células des-diferenciadas, expuestas de forma más directa al medio ambiente de cultivo. El método que garantiza a un mejor nivel la conservación de las características del explante o de la planta

madre, es aquel que utiliza la estimulación de órganos completos en la planta, y este es la proliferación de yemas axilares (Pierik, 1987).

### **4.3 Variación somaclonal**

Es la variación genética originada en plantas que han sido sometidas a cultivo de tejidos, ésta proviene de células somáticas, de ahí su denominación. Dentro de la variación somaclonal, puede encontrarse casos de poliploidia, aneuploidia y a nivel celular pueden existir rompimiento y re-arreglo cromosómico, así como mutación. También puede ser una variación de orden epigenético, es decir, debido al medio ambiente (George, 1993).

Según Cassells *et al.* (2003), la variación somaclonal es una respuesta de la planta al estrés que le produce el cultivo *in vitro*, el cual engloba la percepción del estrés por parte del tejido, la señal interna, la activación de factores de transcripción en respuesta, la reprogramación genética y el cambio en las características de las proteínas y el metabolismo. Debido a que el cultivo de tejidos es un proceso no natural, la planta está constantemente expuesta a una combinación de estrés que no tiene habitualmente en el cultivo normal. Sin embargo, como menciona este autor, es admirable la plasticidad del genoma vegetal para poder descifrar y responder a esta clase de estímulo.

### **4.4 Medios de cultivo para la micropropagación o cultivo *in vitro*.**

El crecimiento y desarrollo *in vitro* de una planta está determinado por una serie de factores complejos como son, su constitución genética, los nutrientes, el agua, los azúcares, factores físicos y algunas sustancias orgánicas entre las cuales están los reguladores de crecimiento (Pierik, 1987). La combinación de esta serie de factores en un nivel óptimo, es la pauta para la obtención de un buen resultado en este proceso y por la misma razón, se trata de un proceso complejo.

La interacción genotipo-medio ambiente es una cuestión que debe tomarse en cuenta desde el inicio del cultivo, ya que, mientras unos genotipos de la misma

especie requieren para su crecimiento y desarrollo altas concentraciones de reguladores y diferentes niveles de macro y microelementos, otros en cambio requieren bajas concentraciones.

El éxito del cultivo *in vitro* está grandemente influenciado por la composición del medio de cultivo utilizado y ésta está basada en los requerimientos de las plantas cuando crecen en un medio natural, es decir sus requerimientos en macronutrientes y micronutrientes, que pueden determinar que la planta se desarrolle, crezca y complete su ciclo (George, 1993).

#### **4.4.1 Elementos minerales**

En la actualidad, los medios de cultivo se elaboran a partir de mezclas de sustancias sintéticas. Es evidente que encontrar un medio nutritivo equilibrado, apto para el crecimiento de los tejidos de una planta y que éste no haya sido reportado con anterioridad, requiere una inversión considerable de tiempo y dinero; sin embargo existe una gran cantidad de medios reportados que pueden utilizarse para comenzar la elaboración de un protocolo de micropropagación para una especie específica. Los llamados medios basales que representan el punto de partida en la experimentación para un protocolo de cultivo de tejidos son aquellos que contienen cantidades específicas de elementos minerales en proporciones más o menos balanceadas para el desarrollo de muchas especies. Los contenidos de macro y microelementos de los medios reportados por Murashige y Skoog (1962) Schenk y Hildebrandt (1972) y Gamborg (1968) utilizados en la presente investigación, se describen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Composición de sales minerales en los medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), SH (Schenk y Hildebrandt, 1971) y B5 (Gamborg, 1976)

Concentración Medio	mg/l		
	MS	SH	B5
KNO <sub>3</sub>	1900	2500	2500
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650		
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		300	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			134
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O			150
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	200	250
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	400	122.09
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O			130.5
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	16.9	10	10
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6	1	2
H <sub>3</sub> B <sub>3</sub>	6.2	5	3
KI	0.83	1	0.75
CUSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025	0.2	0.025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25	0.1	0.25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025	0.1	0.025
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.85	15	27.8
NaEDTA·2H <sub>2</sub> O	37.25	20	37.3

#### 4.4.2 pH

Según Butenko (1968), el cultivo de tejidos en un pH en el rango 5.0 – 6.5 es apto para el crecimiento, con un máximo alrededor de 6.0; fuera de ese rango, generalmente se frena el crecimiento y desarrollo del cultivo *in vitro*. Si el pH es demasiado bajo, pueden presentarse las siguientes complicaciones.

1. La auxina ácido Indolacético y el ácido giberélico se hacen menos estables.
2. El agar pierde rigidez.
3. Algunas sales (de fosfato y hierro principalmente) pueden precipitar.
4. La vitamina B<sub>1</sub> y el ácido pantoténico se hacen menos estables.
5. Se retarda la absorción de iones amonio.

El pH también varía con el proceso de esterilización en autoclave, si se parte de un pH en el rango 5.0 a 6.5, generalmente sufre un descenso de 0.3-0.5 unidades. Una vez establecidas las plantas en el medio de cultivo, existe un proceso buffer, que lo hace estable.

#### 4.4.3 Potencial osmótico

El potencial osmótico de un medio nutritivo, resulta de sumar los potenciales osmóticos del agar y del resto de sus constituyentes (minerales, azúcares, etc). El cálculo de éste potencial resulta complicado, ya que influyen no solo los pesos moleculares de las sustancias, sino además el grado de disociación de las sales que lo componen. En la práctica, el potencial osmótico final, debe ser determinado por medida directa. Los azúcares tienen una mayor influencia sobre el potencial osmótico y se debe tener en cuenta que la hidrólisis de los azúcares da lugar a moléculas más sencillas con diferente potencial osmótico. Éste está también influenciado por el pH (Butenko, 1968).

#### 4.4.4 Reguladores de crecimiento

Las hormonas son por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores que influyen sobre el crecimiento y desarrollo; actúan en lugar diferente a donde se producen y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades.

Actualmente se han desarrollado muchos compuestos sintéticos que tienen la misma constitución y función que las hormonas, éstos son los llamados reguladores de crecimiento y son los responsables de la distribución de los compuestos que la planta biosintetiza además de que determinan el crecimiento relativo y la diferenciación de muchas partes de la planta (George, 1993).

En el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, los reguladores, especialmente las auxinas y citocininas juegan un papel muy importante. Se puede decir que el cultivo de tejidos es casi imposible sin la utilización de reguladores de crecimiento. La adición de estos compuestos al medio de cultivo, depende del tipo de explante que se está utilizando y el método de propagación deseado.

Las auxinas y citocininas más frecuentemente utilizadas en el cultivo de tejidos y sus abreviaturas, se muestran en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Auxinas y Citocininas más frecuentemente utilizadas en el cultivo de tejidos

SUSTANCIA	ABREVIATURA	TIPO DE ACCION
Ácido Indolacético	IAA	Auxina
Ácido Indolbutírico	IBA	Auxina
Ácido Naftalenacético	NAA	Auxina
Ácido, 2,4 diclorofenoxiacético	2,4-D	Auxina
Kinetina (cinetina)	KIN	Citocinina
Bencilaminopurina	BA	Citocinina
2, isopentiladenina	2iP	Citocinina
Bencilamino 2, tetrahidropiranyl adenina	PBA	Citocinina

Fuente: George, (1993).

#### 4.4.5 Agentes gelificantes

Los agentes gelificantes, tienen la función de dar sostén a los cultivos que se someten a una propagación *in vitro* y su funcionalidad está basada en el incremento de viscosidad del medio nutritivo. El material que se utiliza con este fin,



debe ser susceptible de ser esterilizado por autoclave, por lo que el medio es líquido mientras se somete a alta temperatura y una vez que ésta decrece, se solidifica.

Uno de los materiales más utilizados es el agar que da al medio su característica semi-sólida. Es un material muy estable en el tiempo por lo que es ampliamente utilizado en el cultivo de tejidos. Está compuesto por una mezcla de polisacáridos contruidos a partir de la galactosa, se obtiene de algas marinas y constituye una cadena sin carga eléctrica, por lo que es un elemento que no modifica las características químicas del medio nutritivo (George, 1993).

#### **4.5 Micropropagación del género *Agave* spp.**

Es importante mencionar algunas experiencias reportadas en la literatura para el género *Agave* spp, en las cuales se observan los diferentes medios de cultivo basales que se han utilizado.

Mes (1977) encontró gran facilidad para producción de callo en el cultivo de varias especies de agave, utilizando como explante semillas y estableciendo en un medio Linsmaier y Skoog (1965) (citado por Mes, 1977) y utilizando 2,4-D y KIN.

Posteriormente, Robert *et al.* (1987), utilizaron el medio SH para la obtención de organogénesis indirecta en *Agave fourcroydes* Lem (henequén) y menciona que es importante el balance  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  para la eficiencia y control en la producción de callo y posteriormente la producción de brotes adventicios u organogénesis.

Powers y Backhaus (1989) encontraron un método para la producción *in vitro* de *A. arizonica* utilizando como medio basal MS e implementando subcultivos según el desarrollo de la planta, primero en medio adicionado con 2,4-D para obtener callo, después utilizando las citocininas BA y NAA para promover la formación de brotes adventicios y finalmente enraizamiento en un medio libre de reguladores de crecimiento. Este procedimiento es un antecedente importante para el manejo de las plantas del género *Agave* spp *in vitro*.

Binh *et al.* (1990), trabajó con tres especies de agave: *A. cantala* Roxb, *A. fourcroydes* Lem y *A. sisalana* Perrine, y menciona que se obtuvo una producción de plántulas en forma rápida, utilizando el medio MS y con la combinación de tres reguladores de crecimiento, ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIB) y cinetina (KIN), sin embargo, sus resultados muestran la multiplicación de los agaves a través de organogénesis indirecta (es decir, con la previa producción de callo), proliferación de yemas axilares y además formación de brotes adventicios, según la combinación de los reguladores de crecimiento. Los explantes usados fueron hijuelos de rizoma.

Das (1992), encontró un medio de propagación por organogénesis directa para *A. sisalana* utilizando medio basal MS suplementado con BA, mientras que Nikam (1997) trabajando con la misma especie, utilizó los medios basales SH, MS, Gamborg (B5) y White suplementados con diferentes concentraciones de BA, KIN, NAA, IAA y 2,4-D obteniendo organogénesis indirecta en todos los casos.

Rodríguez-Garay *et al.* (1996) reporta la regeneración de plantas de *A. victoria-reginae* a partir de embriogénesis somática utilizando un medio MS suplementado con vitaminas L2 (Phillips and Collins, 1979), 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y 2,4-D.

Por otro lado, aunque la literatura reporta para el género *Agave*, la micropropagación a través de organogénesis, proliferación de yemas axilares e incluso embriogénesis somática, el método de propagación que puede considerarse más eficiente para la conservación de las características genéticas del individuo que se propaga, es la proliferación de yemas axilares, en donde se aprovecha la preexistencia en el explante de brotes diferenciados cuyo desarrollo pueden estimularse por medio del uso de reguladores de crecimiento (George, 1993). Santacruz-Ruvalcaba *et al.* (1999) obtuvieron un protocolo eficiente para la propagación de *Agave parrasana* Berger a través de proliferación de yemas axilares, utilizando un medio de cultivo MS adicionado con vitaminas L2 y BA como regulador de crecimiento.

Respecto a la micropropagación, se concluye que no existe aún un protocolo publicado para la micropropagación de *Agave tequilana* por proliferación de yemas axilares, el cual es recomendado para obtener plantas estables genéticamente.

#### **4.6 Variabilidad genética asexual.**

Como puede observarse en el punto anterior, la micropropagación del género *Agave*, es una práctica que se realiza desde hace aproximadamente 20 años. Esta actividad fue comenzada, como lo menciona Robert *et al.* (1992) debido a la creencia de que muchos de los cultivares de este género eran clones estériles, en ocasiones poliploides que raramente producen semillas viables.

Una realidad tangible en este cultivo, es que en la práctica los productores han reducido la propagación sexual que puede darse en esta especie debido a la práctica de eliminación del escapo floral de las plantas, cuando se quiere estimular la acumulación de azúcares en el tallo, previo a su cosecha o jima.

Según menciona Robert *et al.* (1992), la variabilidad genética en el campo, es muy limitada por lo que la micropropagación puede ser una técnica que permita la multiplicación de individuos que se observen en el campo con características favorables.

Sin embargo, actualmente se han presentado algunas publicaciones que contradicen este hecho. Tal es el caso de la variabilidad genética asexual reportada por Infante *et al.* (2003) en poblaciones de henequén *A. fourcroydes* formadas por propagación asexual, en donde se menciona que existieron diferencias genéticas detectadas con marcadores AFLPs<sup>4</sup> entre hijuelos producidos por una misma planta madre y entre plantas madre dentro de una misma población.

Torres-Morán *et al.*, (2004<sup>a</sup>) reportó que explantes de *A. tequilana* establecidos *in vitro*, mostraban una capacidad diferencial para la producción de brotes. En ese estudio, se advirtió que el comportamiento de esa variable no presentaba una

---

<sup>4</sup> Amplified Fragment Length Polymorphism

distribución normal y que esta variabilidad sugería más de un grupo de plantas con diferente capacidad de producción. En un trabajo posterior Torres-Morán *et al.*, (2004<sup>b</sup>) señalan que el estudio de la producción de brotes de esta especie, separa los clones en dos grupos, uno con producción de brotes con tendencia lineal y otro con tendencia exponencial, observada a partir de la décima resiembra del material. También se menciona que esa tendencia puede deberse a que los hijuelos provenían de dos o más poblaciones diferentes. En el caso de esta especie es necesario realizar mas investigación relacionada con variedad genética asexual.

#### **4.7 Influencia del nitrógeno en los cultivos *in vitro***

Al igual que las plantas que crecen en condiciones normales, las que se desarrollan en condiciones *in vitro* necesitan el nitrógeno en cantidades relativamente más grandes que otros elementos minerales, ya que es el constituyente de compuestos básicos como los aminoácidos, los ácidos nucleicos y muchas otras proteínas componentes de la célula. Es por ello que la deficiencia de este elemento se manifiesta inmediatamente en el crecimiento de la planta.

La influencia del nitrógeno en los cultivos *in vitro* es muy grande, puede mencionarse principalmente su importancia en la morfogénesis y diferenciación de los tejidos (formación de brotes, raíz, etc.) y su participación en los procesos fisiológicos que sustentan el desarrollo vegetativo de las plantas.

Castro-Concha *et al.* (1990) encontraron que la relación  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  en el medio de cultivo, es un factor determinante en los procesos de diferenciación de los tejidos en plantas de agave y una alta concentración de estos iones, produce vitrificación. Es innegable la importancia de este elemento en el crecimiento y desarrollo de las plantas, tanto en las que se producen *in vitro* como en las que crecen de manera normal en ambientes *ex vitro*.

Las plantas crecen efectivamente en medios nutritivos que contengan los dos tipos de nitrógeno, ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ ) en vez de los que utilizan una sola fuente nitrogenada. La mayoría de los medio utilizados, incluyen una cantidad menor de amonio que

de nitrato, ya que como menciona George (1993) algunos eventos morfogénicos dependen de ello. Los requerimientos de estas formas de nitrógeno en cada especie, pueden determinarse solamente a partir de experimentación.

Según George (1993), el crecimiento y la morfogénesis *in vitro*, está grandemente influenciada por la disponibilidad y la forma en que el nitrógeno está presente en los medios de cultivo, ya que las plantas utilizan la forma más reducida de los elementos para su metabolismo y dentro de la planta el nitrógeno se encuentra en esa misma forma. La remoción del oxígeno de un compuesto químico y su sustitución con el elemento hidrógeno ( $H^+$ ), es un proceso denominado *oxidación*. Comparado con el ion nitrato ( $NO_3^-$ ), el amonio ( $NH_4^+$ ) es la forma más altamente oxidada de este elemento. Como una fuente de nitrógeno reducido, las plantas que se encuentran en un medio de cultivo están capacitadas para la utilización de aminas primarias  $R-NH_2$  y amidas  $R-CO-NH-R'$  <sup>5</sup>

Las principales aminas utilizadas en la elaboración de medios de cultivo son el  $NH_3$  que disuelto en agua se convierte en el ion  $NH_4$  y los aminoácidos timina y citosina. Las amidas son usadas con menos frecuencia a excepción de la urea ( $NH_2-CO-NH_2$ ).

En cultivos que se desarrollan en medio nutritivo deficiente en nitrógeno, las hojas o brotes toman una apariencia leñosa debida a la presencia de abundantes carbohidratos que no se utilizan en la síntesis de aminoácidos o de otros compuestos nitrogenados. Puede suceder también que los carbohidratos que no se utilizan en la síntesis de compuestos nitrogenados, sean utilizados en la síntesis de antocianinas, lo cual promueve la acumulación de pigmentos en los tejidos, síntomas que permiten identificar la deficiencia de este elemento (Taiz y Zieger, 1998).

Lo anterior fue comprobado por Camacho *et al* (1999), asociando la reducción de nitratos y el incremento de carbohidratos en hojas de tomate a partir de deficiencia

---

<sup>5</sup> Donde R y R' son grupos funcionales

en boro, comprobando también la reducción sustancial de las cantidades de nitrógeno en las hojas.

McIntyre (2001) afirma que el agua y el nitrógeno juegan un rol importante como factores limitantes en el desarrollo de las plantas y pueden ser una alternativa para sustentar mecanismos de desarrollo *in vitro* que hasta ahora están controlados por las hormonas y los reguladores de crecimiento.

McIntyre (2001), menciona que yemas y rizomas de la especie *Elytia repens* L. suprimen su dominancia apical cuando se les incrementa el nivel de nitrógeno en el medio de cultivo y este hecho, no solo promueve el crecimiento de sus yemas, además tiene efectos morfogénicos, ya que fomenta la aparición de brotes de rizomas.

Recientes investigaciones muestran que, la adición de ambas formas nitrogenadas en los medios nutritivos para plantas, inducen una oscilación significativa en las tasas diarias de crecimiento de las hojas y que estas tasas están correlacionadas con oscilaciones en la concentración de citocininas (aunque no de  $\text{NO}_3^-$ ) en la savia dentro del xilema. Dentro de la planta, se ha estudiado la translocación de los iones amonio y nitrato y actualmente se cuenta con reportes hechos por Schjoerring *et al.* (2002) que apoyan el supuesto de que el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) es también un elemento que se transloca desde la raíz hasta las partes vegetativas de la planta. Los resultados en el estudio de este fenómeno han estado supeditados al incremento en la precisión de la medición del mismo, pues existe una interferencia entre la medición del ion amonio con otros compuestos nitrogenados como los aminoácidos; Schjoerring *et al.* (2002) lograron identificar la translocación de este elemento, utilizando un método fluorométrico.

Forde y Cole (2003), mencionan que para muchas especies vegetales,  $\text{NH}_4^+$  por si mismo, no es preferido como fuente de N, puesto que crecen más lentamente en presencia de éste ion que de nitrato, y a pesar de este hecho, reconocen que el rendimiento y calidad de frutos, es mayor en abundancia de ésta forma nitrogenada, Lips, citado por Forde y Cole (2003) propone un modelo para explicar que el balance  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  puede regular el mecanismo entre el

crecimiento vegetativo y reproductivo; este modelo está basado en la observación de que el  $\text{NO}_3^-$  promueve la producción de citocinina en la raíz, mientras que el  $\text{NH}_4^+$  promueve la producción de Ácido Abscisico .

Por lo anterior, en el presente trabajo se consideran tres diferentes medios basales para la composición del medio de cultivo *in vitro*, que contienen las fuentes de nitrógeno necesarias para proveer el elemento en sus dos formas más utilizadas por la planta.

#### **4.8 Influencia del calcio en los cultivos *in vitro***

Nobel y Berry (1985) encontraron que los agaves pueden crecer en amplios rangos de concentración de calcio en el suelo, además de que éste elemento tiene gran importancia en las plantas con metabolismo ácido (CAM) y ello se refleja en la gran acumulación de oxalato de calcio en sus hojas. El estudio llevado a cabo por estos autores, reporta una acumulación significativa en las hojas de *Agave deserti* Engelm. cuando fueron cultivados en medio hidropónico con concentraciones de 12 mM de calcio.

Los iones de calcio ( $\text{Ca}_2^{++}$ ) son utilizados en la síntesis de nuevas paredes celulares, particularmente en las lamelas medias que separan las nuevas células después de la división celular, es también usado en la formación del uso mitótico durante dicha división. Es un elemento requerido para el funcionamiento normal de todas las membranas y es un mensajero secundario en las señales hormonales y de respuesta de la planta al medio ambiente (George, 1993).

Gilroy *et al.*, (1993), mencionan que a nivel de los tejidos vegetales, es requerido un suministro de calcio en el rango de 1-10 mM para mantener un crecimiento y desarrollo normal, además que éste es el segundo metal más abundante y el quinto elemento encontrado en mayor cantidad en las plantas, después del C, H, O, N y K. A nivel subcelular, ciertos organelos como las vacuolas centrales, pueden tener concentraciones similares de calcio, pero en el citoplasma, se encuentran concentraciones de tres a cuatro veces menores.

En su recién descubierta función como mensajero secundario, el calcio se enlaza con el *calmodulin*, una proteína encontrada en el citosol en las células vegetales y este complejo calcio-calmodulin regula muchos procesos metabólicos, principalmente relacionados con la actividad hormonal de giberelinas y ácido abscísico (Taiz y Zieger, 1998)

El estudio a nivel celular y molecular de la acción calcio-calmodulin, es muy reciente y se ha llevado a nivel de expresión génica. Un ejemplo, son los estudios llevados a cabo por Ildoo *et al.* (2000), referentes a cómo el calmodulin regula una única subfamilia de bombas citosólicas de  $Ca_2^{++}$  encontradas en plantas. Estos autores mencionan que la regulación temporal y espacial de las cantidades de este catión dentro de la célula vegetal no está estudiada suficientemente, sin embargo es evidente su presencia en el retículo endoplasmático y el trabajo que reportan asocia el complejo calcio-calmodulin con la transcripción de un gen para bombas de calcio en levaduras. Este mecanismo es importante, como lo menciona Bush (1993), por el bombeo regulatorio que la célula vegetal debe hacer del citosol a otros organelos dentro de la planta.

A pesar de la abundancia de calcio en los tejidos de la planta, debe estar disponible en las pequeñas cantidades requeridas para los procesos metabólicos celulares, ello requiere que el suministro de este elemento sea de manera ininterrumpida.

Por otra parte, tanto *in vitro* como en ambiente normal, los síntomas característicos de la deficiencia en calcio, pueden incluir necrosis en las regiones meristemáticas, como en las puntas de la raíz o en hojas jóvenes. Esto ha sido reportado en estudios como el llevado a cabo por Malone *et al.* (2002) en plantas de tomate en invernadero, que mostraron la movilización del calcio hacia hojas jóvenes debido a su rapidez de transpiración, mientras las hojas más viejas mostraban tejidos con apariencia de quemadura y mucho menor nivel de calcio acumulado.



#### **4.9 Adaptación de las plantas propagadas por cultivo *in vitro*.**

La aplicación práctica y comercial principal del cultivo de tejidos, es la posibilidad de adquirir en poco tiempo, una gran cantidad de plantas con genotipos y fenotipos deseables. Esto no es posible sin el último paso de la micropropagación, que es la adaptación de las plantas al medio ambiente *ex vitro*. El aspecto que debe considerarse y probablemente sea también el más estudiado en lo que se refiere a la adaptación, es el medio ambiente de cultivo; el cual es controlado en un alto porcentaje mientras las plantas se encuentran en el laboratorio y puede o no estar igualmente controlado durante su aclimatación a condiciones normales.

Murashige (1974) fue el primero en mencionar los factores que deberían modificarse en una etapa que llamó "estado preparatorio" a la aclimatación. Él recomendó el subcultivo en un medio modificado en su contenido de azúcar y de nutrientes, así como reducir la intensidad luminosa y utilizar auxinas para promover la formación de raíz. Estas medidas estimulan a la planta a recuperar su autotrofia.

Por otro lado, la cutícula, que es la superficie que recubre a las plantas superiores, es un lípido extracelular que actúa como protección entre la planta y su medio ambiente. Según Holloway (1982), el mayor componente de esta membrana es la cutina, que es un polímero de ácidos grasos hidroxilados e hidroxiepoxilados, en un estudio realizado con  $C^{14}$  radiactivo en hiedra, se demostró que el nivel radiactivo era mucho mayor en hojas jóvenes de esta planta después de su aclimatación a invernadero que durante su producción *in vitro*, lo que supone que la cutícula se sintetiza mayormente cuando la planta se encuentra en condiciones normales.

La presencia de azúcar en el medio de cultivo es responsable de la baja tasa fotosintética, ya que ésta inhibe la producción de ribulosa-bisfosfato-carboxilasa que es una enzima clave en la fotosíntesis, otro factor importante es la intensidad luminosa, que sumada con la falta de intercambio gaseoso modifica totalmente las condiciones en las que una planta fotosintetiza (George, 1993).

Las diferencias esenciales entre el ambiente *ex vitro* al que se someterá la planta y el ambiente que tenía en laboratorio, son la alta intensidad luminosa, menor humedad relativa y presencia de microorganismos. El cambio de un ambiente al otro, produce un gran estrés en la planta micropropagada. La eficiencia en el establecimiento depende en primer lugar del tipo de planta y en segundo del manejo que se le de al nuevo ambiente que ésta encontrará.

En los agaves, la situación en lo que se refiere a la cubierta epicuticular cerosa que cubre la superficie de la cutícula, es que ésta puede tomar varias formas, desde depósitos amorfos hasta cristalinos sobre la cutícula, consistentes en complejas mezclas de grandes cadenas alifáticas o de lípidos cíclicos. Algunos estudios han demostrado que la textura cristalina y la calidad de la cera epicuticular en la superficie de las hojas de plantas micropropagadas difiere considerablemente de aquellas que crecen en invernadero o en campo (Enríquez *et al.*, 2000).

Según Rohr *et al.* (2003), el cultivo *in vitro* produce anomalías anatómicas en las hojas, raíces y brotes de la planta y puede también afectar procesos fisiológicos. Estos cambios pueden reducir la eficiencia de los tejidos a sobrevivir en condiciones diferentes a donde fueron originados.

Read y Preece (2003) mencionan que el comportamiento de un explante establecido en cultivo *in vitro*, depende de las condiciones ambientales en las que haya estado la planta madre, así mismo, mencionan que se han llevado a cabo estudios que demuestran la influencia de la nutrición de la planta madre en el resultado que se tiene en el desarrollo *in vitro*, por ejemplo, Read *et al.* (citado por Read y Preece, 2003) demostraron que se obtenía menor proliferación de yemas en explantes de tomate tomados de una planta desarrollada en niveles bajos de N, comparado con el número de yemas obtenidas en explantes de plantas fertilizadas en niveles altos de N; también se demostró que niveles bajos de N detectados en hojas de plantas madre, propiciaban menos producción de brotes que en hojas con alto nivel de N.

Estos mismos autores mencionan que la luz influye en muchos de los procesos morfogénicos *in vitro*, como el enraizamiento de microinjertos de azalea, el incremento de número de brotes en tabaco cultivado bajo luz roja, obtención de gran cantidad de protoplastos de cebada en bajas intensidades luminosas, etc.

La realidad es que las plantas producidas *in vitro* están expuestas a una atmósfera saturada de humedad y esto modifica el comportamiento de los tejidos. Los cambios producidos son: bajas tasas de fotosíntesis, control errático de los estomas y absorción errática de humedad ya que generalmente la producción de brotes y de raíz en las plantas de laboratorio son eventos que se producen por separado. Durante la aclimatación, estas modificaciones se traducen en ocasiones en grandes pérdidas de plantas, dependiendo de la naturaleza de los tejidos y de la especie de que se trate. Los estomas también sufren modificaciones considerables. Ellos regulan mediante su cierre y/o apertura el intercambio gaseoso entre el las células del mesófilo en palisada y la atmósfera.

Wardle *et al* (citado por Rohr *et al*, 2003) encontraron que hay una correlación positiva entre el decremento en el número de células del mesófilo y la modificación de la estructura y funcionamiento de los estomas, estudios histológicos demostraron que hojas de varias especies leñosas cultivadas *in vitro* tenían mucho menos desarrolladas las células del mesófilo en palisada que aquellas cultivadas en invernadero o a cielo abierto.

Los estomas de las plantas *in vitro*, generalmente son más largos y anchos que en las otras plantas. La humedad relativa y la intensidad luminosa afectan la morfología, estructura y densidad de los estomas, pero no se ha estudiado aún la forma de interacción de estos factores en el medio ambiente para provocar este resultado (Rohr *et al*, 2003).

En el sistema radicular también se presentan modificaciones, tales como menor producción o ausencia de pelos radicales y también ausencia de conexión entre la raíz y el brote; además el sistema radicular generado por los brotes adventicios es diferente al producido en embriones somáticos, los brotes adventicios producen raíces laterales frágiles, mientras que los embriones somáticos si tienen

meristemo radicular que posteriormente se convierte en un sistema radicular normal (Rohr *et al.*,2003).

Una de las principales razones de la pérdida de plantas durante la aclimatación es precisamente el deficiente sistema radicular, sin embargo, aún no se aclara porque la mayoría de las raíces producidas *in vitro*, persisten durante la aclimatación.

Es importante implementar una sistema eficiente de aclimatación de la especie micropropagada, basado en la observación de cómo evolucionan las plántulas progresivamente, modificando en forma gradual su anatomía y morfología y por supuesto, el funcionamiento de sus estomas.

Torres-Morán *et al* (2004<sup>b</sup>), mencionan que en el caso del *Agave tequilana* Weber variedad azul, es necesario que se lleve a cabo un periodo de enraizamiento también *in vitro* después de la fase constante de propagación. Durante esta fase, se permite que los tejidos de la hoja tomen consistencia cerosa y las plantas emitan raíces que faciliten su adaptación. Comprobaron que existen diferencias significativas en la adaptación de plantas de agave enraizadas en un medio de cultivo con bajo contenido en nitrógeno y otro con alto contenido de nitrógeno y ambos incrementados en sacarosa como fuente de carbono y ausencia de reguladores de crecimiento. Las plantas enraizadas *in vitro* en un medio con bajo contenido de N tuvieron mayor adaptación y mejor calidad que en el otro medio.

Es evidente que tiene una marcada influencia el estado de nutrición y medio ambiente, tanto de las plantas madres que proveen el explante para iniciar una propagación *in vitro* como las condiciones de éstas antes de ser aclimatadas en invernadero.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Selección del explante y preparación del material

El material vegetativo inicial (o explante) para el establecimiento del cultivo se obtuvo de hijuelos producidos por plantas de dos años en campo y certificadas por el Consejo Regulador del Tequila de acuerdo con la Norma NOM-EM-037-FITO-2002.

El punto de partida de un protocolo de micropropagación es el establecimiento del material elegido como explante, que para el caso de este trabajo fue el meristemo apical. Por lo tanto, se seleccionaron plantas madre asintomáticas para la pudrición de tallo y libres de plagas, los hijuelos se eligieron en base a su tamaño, siendo éste el conocido como tamaño limón (Figura 1).

Se colectaron 39 hijuelos, a los que se les eliminaron las hojas y parte del tallo hasta obtener un fragmento cilíndrico de aproximadamente 3 cm de diámetro, la secuencia del establecimiento se indica en la Figura 2.



Figura 1. Hijuelos de agave seleccionados en campo para ser usados como explante inicial.

La desinfección de los explantes se hizo con una solución de hipoclorito de sodio al 3%, obtenida de una solución comercial al 6% diluida 1:1 en agua. El tratamiento de desinfección se realizó en condiciones asépticas en campana de flujo laminar.

Para eliminar el cloro de la superficie del tejido, se utilizaron dos enjuagues de agua bidestilada estéril.

Una vez realizada la desinfección, se procedió a hacer cortes del tejido dañado por el cloro y se sembró en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1972) y como reguladores de crecimiento se utilizaron la auxina ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y como citocinina, 6-bencilaminopurina (BA) en concentraciones de 0.025 mg/l y 10 mg/l respectivamente.

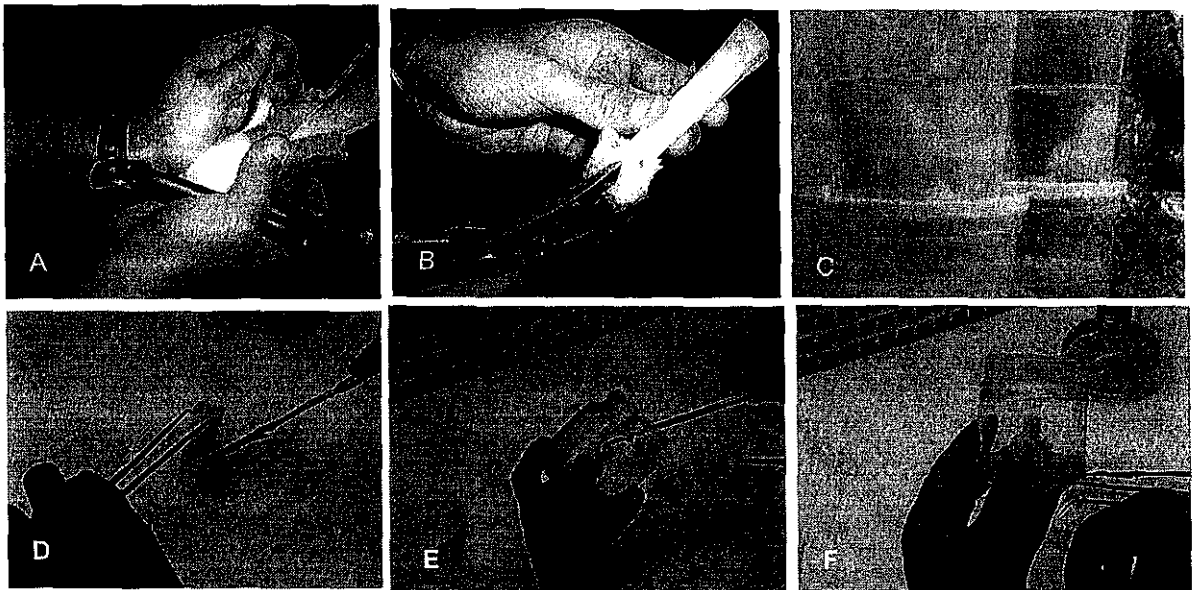


Figura 2. Establecimiento *in vitro* de hijuelos de *A. tequilana*. A. Eliminación de las hojas. B. Corte del tallo. C. Desinfección. D. Corte del tejido muerto. E y F. Siembra en medio de cultivo MS

El medio de cultivo fue distribuido en frascos de vidrio de 100 ml (25 ml por frasco) y esterilizados en autoclave a 121°C de temperatura y 18 lb/pulg<sup>2</sup> de presión durante 15 minutos.

Las condiciones de incubación de los hijuelos establecidos fueron: fotoperiodo de 16 horas luz, 27°C de temperatura y una intensidad luminosa de 1000 lux.

## 5.2 Registro de la producción de brotes.

Después del establecimiento de los hijuelos *in vitro*, se realizaron transferencias a medio de cultivo fresco, cada 30 días y se registró el número de brotes que cada hijuelo produjo, así, se llegó a obtener un lote de brotes de cada hijuelo establecido,

a los que en lo sucesivo se les llamará "clones" por el tipo de reproducción asexual que se utilizó.

Debido a la variabilidad que se presentó en la producción de brotes desde el inicio de los cultivos, el experimento con diferentes niveles de nitrógeno y calcio se realizó seleccionando dos de los clones pertenecientes al grupo más productivo, es decir, del grupo que tuvo producción exponencial a partir del quinto mes, lo cual se reporta en el capítulo de resultados. Una vez que esos clones produjeron el número de brotes suficiente para el experimento se procedió al establecimiento del mismo.

### **5.3 Establecimiento del experimento *in vitro*.**

Los clones elegidos para evaluar la respuesta morfogénica de agave tequilero a la aplicación combinada de nitrógeno y calcio, fueron A4H3 y A10H2 (Agave 4 hijuelo 3 y Agave 10 hijuelo 2).

El experimento se llevó a cabo en un diseño completamente al azar con 4 repeticiones, que consistieron en 4 brotes individuales para cada tratamiento.

Para determinar la dosis de N y Ca se siguió la metodología de superficies de respuesta, con un diseño de tratamientos de acuerdo a un arreglo rotacional central compuesto con 2 factores (N y Ca) con cinco niveles ( $-\alpha$ , -1, 0, 1,  $\alpha$ ); un punto central (0,0) correspondiente a las cantidades originales que consideran los medios basales y cuatro puntos axiales ( $-\alpha, 0$ ;  $0, -\alpha$ ;  $0, \alpha$ ;  $\alpha, 0$ ), en donde  $\alpha = F^{0.25}$  y  $F =$  número de tratamientos del factorial con los niveles -1 y 1 (Cuadro 3).

Los datos obtenidos se utilizaron para ajustar un modelo cuadrático de regresión y encontrar la combinación óptima de estos factores para producir máxima cantidad y calidad de brotes, así como la influencia de esas combinaciones en su adaptación a condiciones de invernadero.

En el Cuadro 3 puede observarse que se utilizaron 9 tratamientos de nitrógeno y calcio en medio basal MS (Murashige y Skoog, 1962) y 9 en medio basal SH (Schenk y Hildebrandt, 1972) además de utilizar el medio B5 (Gamborg, 1968) con

una sola combinación de los elementos; muestra además las diferentes fuentes de nitrógeno y calcio usadas según el medio basal.

Se utilizaron 4 repeticiones de cada tratamiento tomando como unidad experimental un brote individual de una altura aproximada de 3 cm (Figura 3), proveniente de los clones ya mencionados producidos a partir de cada hijuelo.

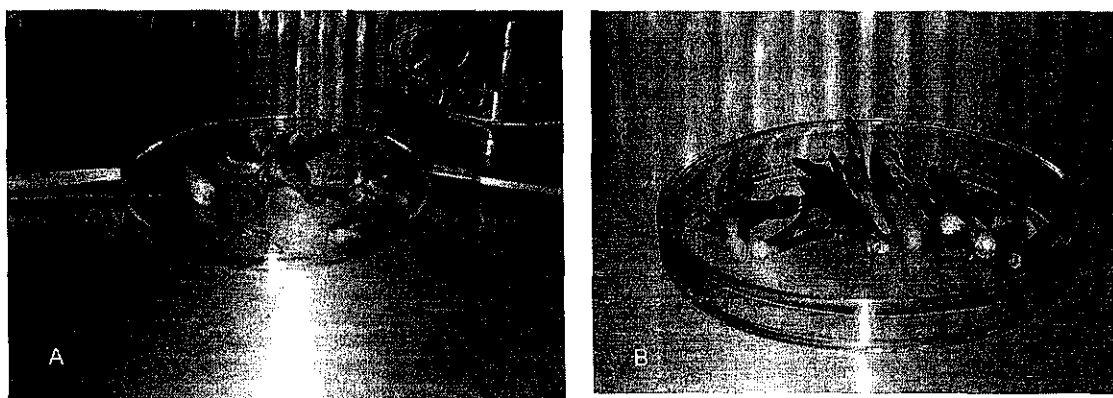


Figura 3. Preparación de los brotes. A. Limpieza de los brotes para siembra en los tratamientos; B. Aspecto de los brotes antes de ser sembrados en medio de enraizamiento *in vitro*.

Cuadro 3. Tratamientos generados para la superficie de respuesta

Tratamientos (Medio basal)	Niveles de nitrógeno	Niveles de calcio	Fuente y Dosis (mg/lit)					
			Nitrógeno				Calcio	
			KNO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
MS-1	-1	-1	950		825		220	
MS-2	-1	1	950		825		220	
MS-3	1	-1	2850		2475		660	
MS-4	1	1	2850		2475		660	
MS-5	0	0	1900		1650		440	
MS-6	-α	0	556.6		483		440	
MS-7	0	-α	1900		1650		129	
MS-8	α	0	3243		2816		440	
MS-9	0	α	1900		1650		751	
SH-1	-1	-1	1250	150			100	
SH-2	-1	1	1250	150			300	
SH-3	1	-1	3750	450			100	
SH-4	1	1	3750	450			300	
SH-5	0 *	0 *	2500	300			200	
SH-6	-α	0	732.2	87.8			200	
SH-7	0	-α	2500	300			58.6	
SH-8	α	0	4267	512			200	
SH-9	0	α	2500	300			341.4	
B5	0	0				134	250	150

\* Los niveles 0 están representados por las cantidades reportadas en los artículos originales.



Los parámetros a evaluar *in vitro* son variables que reflejan el tipo y calidad de la morfogénesis (producción de brotes) por lo que se tuvieron variables cuantitativas y cualitativas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Variables a evaluar en la fase *in vitro*

VARIABLE	TIPO
1. Número de brotes por explante	Cuantitativa
2. Tamaño del brote	Cuantitativa
3. Calidad de los brotes (vitrificación o tejido normal)	Cualitativa
4. Origen de los brotes (Organogénesis, yemas axilares)	Cualitativa
5. Producción de callo	Cualitativa

Al terminar de evaluar los brotes en la fase *in vitro*, se procedió a la adaptación de los mismos en invernadero. Después de la fase de enraizamiento *in vitro*, se realizó una siembra en medio MS adicionado con sacarosa, se incubaron en las mismas condiciones del establecimiento hasta la emisión de raíces.

#### 5.4 Adaptación a condiciones de invernadero

Al término de 30 días se procedió al lavado de raíces con agua corriente y se tomaron datos de longitud de raíz y parte aérea al salir el material del laboratorio posteriormente se plantaron en charola germinadora de 60 cavidades en sustrato peat moss o turba canadiense (ver Figura 4).

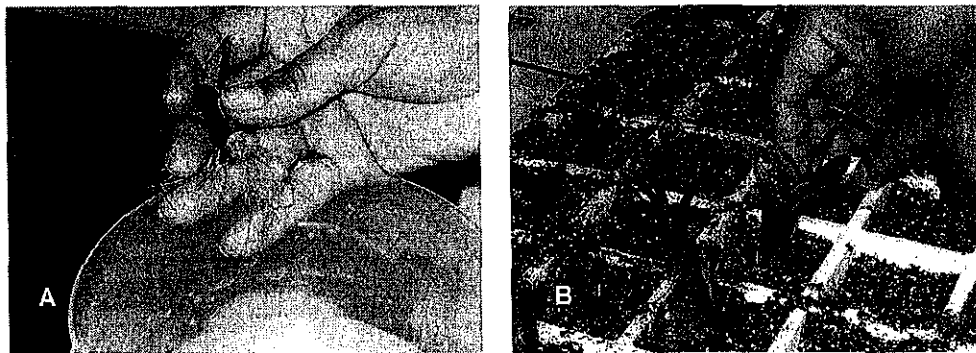


Figura 4. Establecimiento *ex vitro*. A. Lavado de raíces en plántulas producidas *in vitro* de *A. tequilana* B. Plantación en charolas con peat moss.

Las condiciones de adaptación de las plantas fueron las siguientes:

- Temperatura promedio: 27°C

- En charolas germinadoras de 60 cavidades, con cepellón de 6X6X9 cm
- En sustrato peat-moss (turba canadiense)
- En invernadero rústico de plástico.

Se evaluaron durante 60 días y posteriormente se tomaron los datos de parámetros de adaptación

En invernadero, se evaluaron los siguientes parámetros de adaptación:

1. Porcentaje de adaptación (No. Plantas sobrevivientes/ total de plantas)
2. Plantas con producción de hoja *ex vitro* a 30 días de adaptación
3. Producción de biomasa (peso seco).

## 5.5 Análisis estadístico

Se realizó análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar, para todas las variables, con el siguiente modelo matemático:

$$y_i = \mu + \tau_i + \xi_i$$

En donde:

$\mu$  = media de los tratamientos

$\tau_i$  = iésimo tratamiento

$\xi_i$  = Error experimental

Se realizó la comparación de medias utilizando la Diferencia Mínima Significativa (DMS).

Se hicieron algunas comparaciones ortogonales para todas las variables señaladas tanto en la fase *in vitro* como en la de invernadero.

En la prueba de hipótesis efectuada para cada una de las variables, se plantearon las siguientes hipótesis:

$H_0$  = igualdad de medias en todos los tratamientos

$H_a$  = Al menos una de las medias es diferente

El estadístico de prueba en todos los casos de análisis de varianza y de comparaciones ortogonales fue la prueba de Fisher (prueba de F).

Como parte del análisis de los datos en la superficie de respuesta, se probó el ajuste al siguiente modelo cuadrático de regresión:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_1^2 + \beta_4x_2^2 + \beta_5x_1x_2$$

donde  $x_1$  son las dosis de N y  $x_2$  las dosis de Ca.

A partir del modelo anterior, se siguió el procedimiento *stepwise* para eliminar los términos que sean necesarios para encontrar el modelo parsimonioso significativo y con mejor ajuste, de acuerdo a la metodología de Cochran (1980).

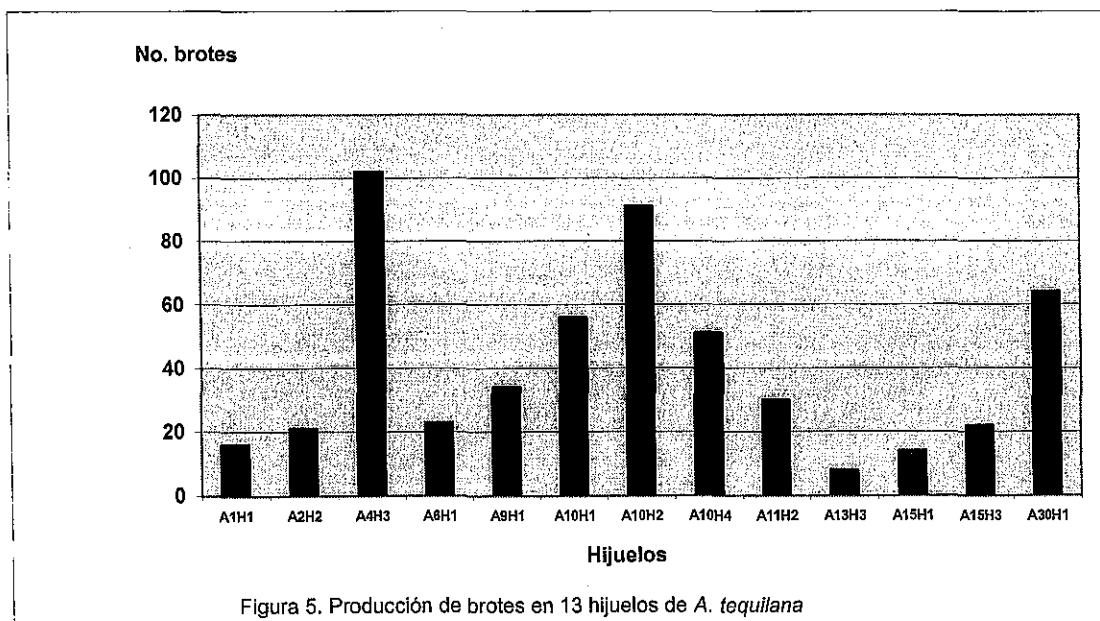
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1 Selección de los clones para el experimento *in vitro*

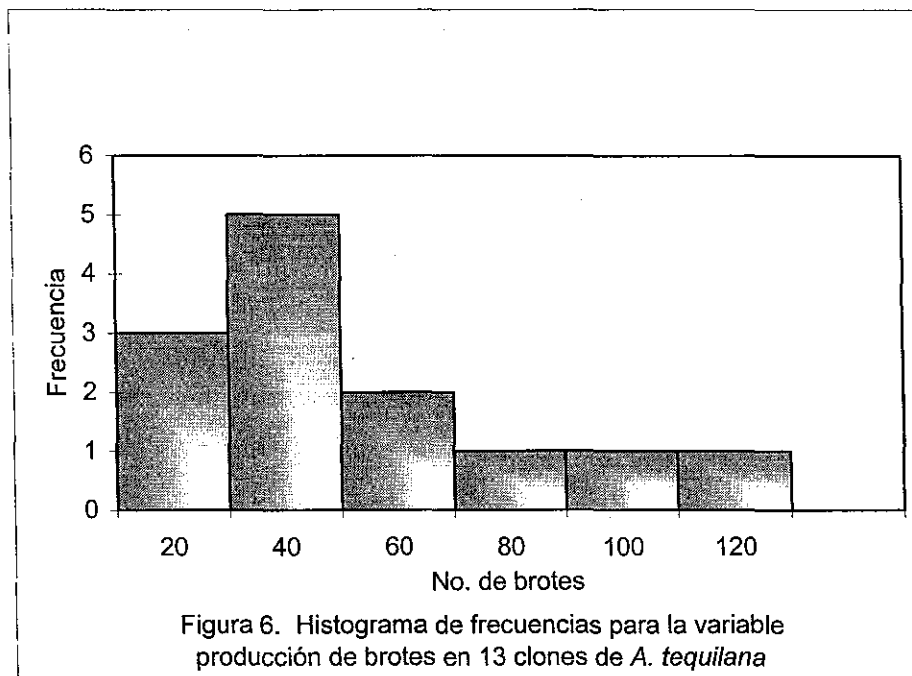
Como se mencionó en el capítulo de materiales y métodos, los clones fueron seleccionados de acuerdo a un estudio realizado en los brotes producidos por los hijuelos establecidos *in vitro*.

De 39 hijuelos colectados, se lograron establecer 13, lo que representa una eficiencia terminal de establecimiento de 41.46%, obtenida a un año del establecimiento, el bajo porcentaje se debió a que en los hijuelos se encontró contaminación endógena y fue manifestándose a lo largo de las resiembras.

El conteo de los brotes producidos por cada uno de los trece hijuelos, se representó en la Figura 5. donde se observa que esta variable tiene un comportamiento bimodal, por lo que se asume que los datos no se ajustan a una distribución normal ni tampoco binomial, este hecho resulta evidente en la Figura 6 La estadística descriptiva que apoya estos supuestos, reportó una media de 40.92, una varianza de 897.74, una desviación estándar de 29.96 y un coeficiente de variación de 73.21%.



La variación que se observa en la Figura 5, sugiere no uniformidad de los materiales, por lo que esto hubiese podido influir de forma muy significativa en el resultado del experimento que se plantea al inicio de este trabajo.



La variable "producción de brotes" fue evaluada a lo largo de 15 resiembras del material, lo que proporcionó mayor información sobre el comportamiento de la misma.

La representación gráfica de ésta variable, separó los clones en dos grupos, uno que presenta crecimiento exponencial a partir de la octava resiembra y otro que continuó con un crecimiento con tendencia lineal desde el inicio del establecimiento (Figura 7). Los clones considerados para los experimentos del presente trabajo, pertenecen ambos (A4H3 y A10H2) al grupo que tuvo crecimiento exponencial.

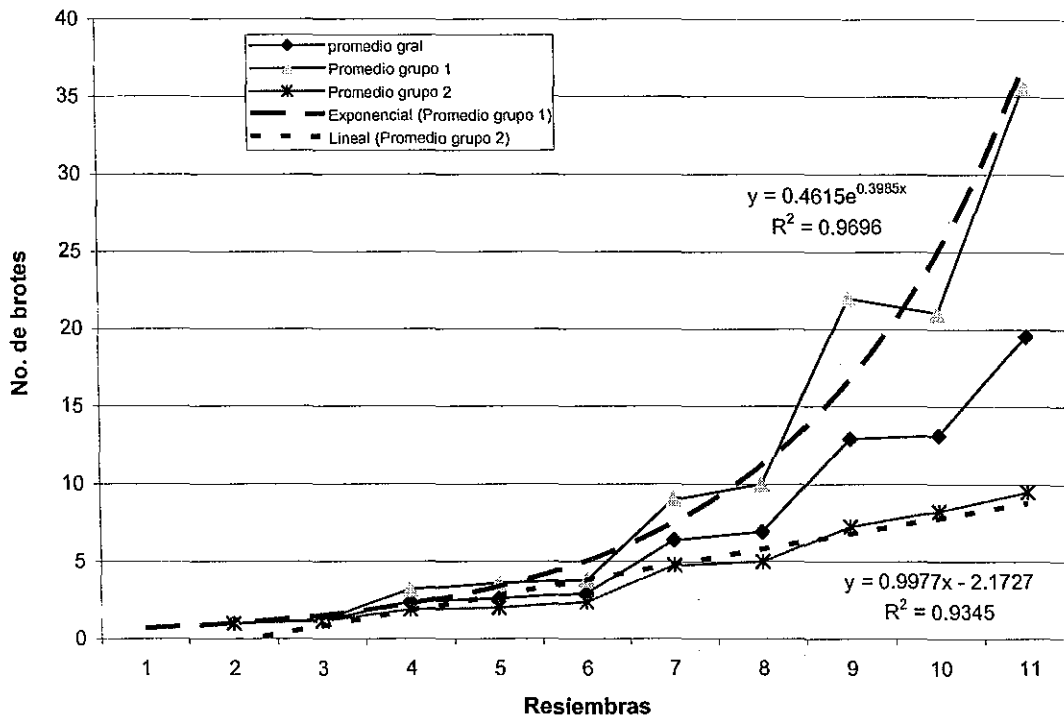


Figura 7. Representación del comportamiento en producción de brotes de los dos grupos de clones y sus líneas de tendencia a lo largo de 15 meses de cultivo.

Con base en la variación encontrada, el experimento con niveles de N y Ca se hizo con brotes provenientes de un solo hijuelo.

Para el establecimiento del experimento se requerían un número total de 76 brotes para cada clon, por lo que se seleccionaron solamente los clones A4H3 y A10H2 pertenecientes al grupo de crecimiento exponencial que lograron un total de 102 y 91 brotes respectivamente.

## 6.2 Análisis de varianza de las variables de la etapa *in vitro*

Para efectuar los análisis de varianza que se presentan en esta sección, se inició con el análisis de normalidad de una de las variables (producción de brotes) por el método de Kolmogorov-Smimov utilizando el paquete estadístico Minitab.

El resultado de la prueba de normalidad se presenta en la Figura 8 que reporta no normalidad ( $p < 0.033$ ), por lo que posteriormente se utilizó la transformación de

los datos  $\sqrt{x+1}$  cuyo resultado fue un ajuste adecuado a la normalidad que se reporta en la Figura 9

Normalidad del número de brotes

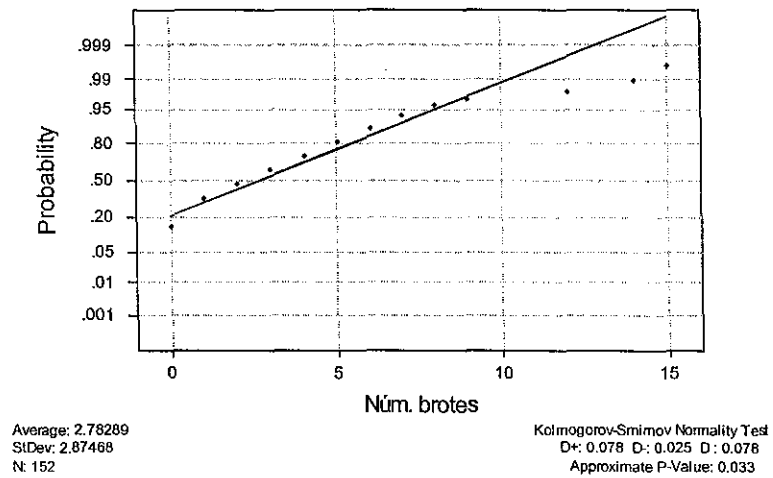


Figura 8 Prueba de normalidad para la variable número de brotes.

Normalidad de la raíz del número de brotes

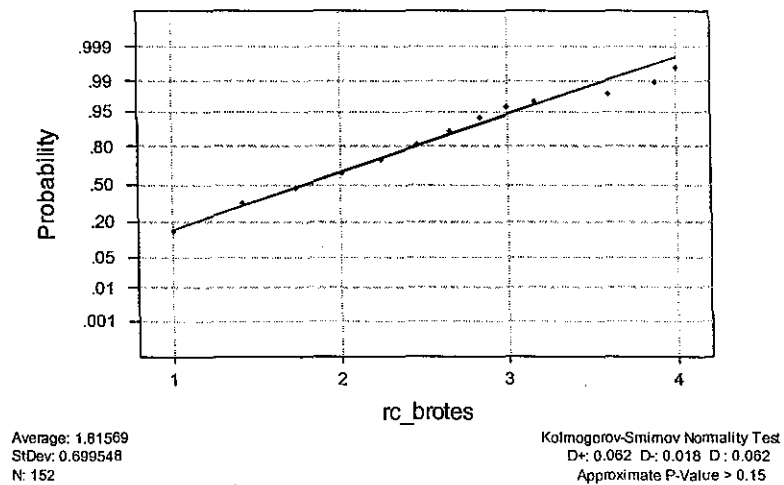


Figura 9 Ajuste a la normalidad en la variable raíz de No. de brotes+1

Para normalizar las variables tomadas tanto *in vitro* como en invernadero, se utilizó la transformación  $\sqrt{x+1}$ , recomendada por Cochran (1980), que respondió adecuadamente, según se muestra en la Figura No. 9.

Una vez hecha la transformación de los datos, se procedió a efectuar un análisis de varianza para cada variable, utilizando un diseño experimental completamente al azar. En estos análisis se detectaron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) para todas las variables.

Por las características del experimento, se utilizaron contrastes ortogonales para hacer comparaciones de clase y de tendencia, en las que se comprobó en primer lugar si las comparaciones propuestas podían ser independientes u ortogonales (Cochran, 1980).

A continuación se mencionan las comparaciones y la prueba de F efectuadas en cada una de las variables. Los elementos utilizados en las comparaciones fueron:

Medios: B5, SH y MS. Clones: A4H3, A10H2



### 6.2.1. Análisis de varianza y DMS para la variable número de brotes.

Cuadro 5. Análisis de varianza para número de brotes

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F tablas</i>
Tratamientos	36.3304623	37	0.98190439	2.9799028	4.8371E-06	1.5153**
Error	37.5640105	114	0.32950886			
<b>Total</b>	<b>73.8944728</b>	<b>151</b>				

\*\* altamente significativo

De acuerdo al cuadro anterior, la diferencia marcada por la prueba de F, sugiere que al menos una de las medias probadas es diferente a las demás ( $p = 4.8371E-06$ ) por lo que se realizó una prueba DMS en los tratamientos probados, el resultado para la variable número de brotes se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Promedios y DMS de la variable número de brotes

<i>Tratamientos</i>	<b>Promedio</b>		<i>Tratamientos</i>	<b>Promedio</b>	
A10H2SH 0,0	3.0415	A	A10H2SH a,0	1.6991	BCD
A10H2SH 0,-a	2.6751	AB	A4H3 MS 0,-a	1.6830	BCD
A10H2SH -1,-1	2.6614	AB	A4H3 SH 0,-a	1.6830	BCD
A4H3 B5 0,0	2.4866	ABC	A10H2MS 0,a	1.6614	BCD
A10H2SH -a,0	2.4604	ABC	A4H3 MS 1,1	1.6526	BCD
A4H3 MS -a,0	2.3428	ABCD	A10H2SH1,1	1.6180	BCD
A10H2MS 0,0	2.3328	ABCD	A10H2SH 0,a	1.6124	BCD
A10H2 MS -1,1	2.3195	ABCD	A10H2MS 0,-a	1.5956	BCD
A4H3 SH -1,-1	2.2205	ABCD	A4H3 MS 0,a	1.4920	BCD
A10H2SH -1,1	2.1100	ABCD	A4H3 MS 0,0	1.4696	BCD
A4H3 MS -1,1	2.0840	ABCD	A10H2MS -a,0	1.4696	BCD
A4H3 MS -1,-1	2.0454	ABCD	A10H2MS 1,-1	1.3107	CD
A4H3 SH 0,0	2.0266	ABCD	A4H3 SH a,0	1.3090	CD
A4H3 SH -1,1	2.0025	ABCD	A4H3 MS a,0	1.2500	CD
A4H3 SH 0,a	1.9568	ABCD	A4H3 SH1,1	1.2500	CD
A10H2MS -1,-1	1.9264	ABCD	A10H2 MS 1,1	1.1830	D
A10H2 SH 1,-1	1.7775	BCD	A10H2MS a,0	1.1036	D
A4H3 SH -a,0	1.7420	BCD	A4H3 MS 1,-1	1.0000	D
A10H2B5 0,0	1.7420	BCD	A4H3 SH 1,-1	1.0000	D

DMS 0.05 = 1.24095912

DMS 0.01 = 1.6025631

Utilizando la DMS 0.05, los primeros 16 resultados constituyen un grupo en donde las medias son estadísticamente iguales ( $p=0.05$ ).

La forma en la que los resultados de esta prueba se agrupan, no permite hacer inferencias sobre tendencias de la respuesta de los clones al medio de cultivo, ya que agrupa indiscriminadamente las variables clon, medio de cultivo y tratamiento de N y Ca. Se puede observar en el Cuadro 6, que 4 de los 6 tratamientos que tienen las cantidades originales de los medios (tratamientos con terminación 0,0) pertenecen al mismo grupo, y estos no pertenecen al mismo clon. Aparentemente, esta prueba sugiere que los clones se comportan de la misma manera, independientemente del medio en el que se cultiven y de la cantidad que se les adicione de los elementos probados (N y Ca), lo cual no refleja lo observado durante el desarrollo del experimento en el laboratorio.

Por lo anterior y tomando en cuenta el experimento por el que se decidió a realizar la prueba de niveles de N y Ca en los clones A4H3 y A10H2 por separado (ver punto 6.1 “*Selección de los clones para el experimento in vitro*”), se procedió a efectuar contrastes ortogonales, tomando en cuenta lo mencionado por Steel y Torrie (1985) y Cochran (1983) en relación a que para que los niveles de significancia tabulados sean válidos, la DMS solo debe usarse para comparaciones planeadas antes de examinar los datos, ya que la naturaleza de los tratamientos usados en el presente experimento, no permite llegar a conclusiones contundentes utilizando esta prueba.

Se encontraron resultados similares para todas las variables, por lo que el cálculo y los cuadros con la DMS para las demás variables, se encuentran en el anexo

### **6.2.2. Contrastes ortogonales para la variable número de brotes.**

Para el caso de la comparación planeada al inicio del presente trabajo, los contrastes ortogonales permiten subdividir la suma de cuadrados obtenida en el análisis de varianza, de tal manera que las comparaciones que resultan

ortogonales ( $\sum_{l=1}^k l_{1k} l_{2k} = 0$ ) puedan utilizarse para comparar los grupos formados

inicialmente; en este caso, clones y medios de cultivo.

Los contrastes efectuados en esta variable fueron:

1. El medio B5 comparado contra los medios SH y MS.
2. Los 2 clones (A4H3, A10H2) cultivados en el medio MS contra los mismos clones (A4H3, A10H2) en el medio SH.
3. El clon A4H3 cultivado en los dos medios (MS,SH) contra el clon A10H2 también cultivado en los dos medios basales (MS,SH)
4. El tratamiento B5 del clon A4H3 contra el tratamiento B5 del clon A10H2.

Cuadro 7. Prueba de F en los contrastes ortogonales para la variable número de brotes:

	ZW	ZW <sup>2</sup>	DW	SC Y CM	FC	F0.05	F 0.01	
1	-45.3886508	2060.12962	684	3.01188541	9.14052924	3.92432753	6.86259227	**
2	-19.6959624	387.930937	36	10.7758594	32.7027905	3.92432753	6.86259227	**
3	-17.3931336	302.521097	36	8.40336381	25.5026943	3.92432753	6.86259227	**
4	2.97819561	8.86964907	2	4.43482453	13.458893	3.92660127	6.86259227	**
			<b>GL= 114</b>	<b>CM error</b>	<b>0.32950886</b>			

ZW = valor del contraste

DW = línea ortogonal de la matriz de contrastes

\*\* altamente significativo

Como puede observarse en el cuadro anterior, todas las comparaciones hechas fueron altamente significativas.

En el primer contraste, en donde se probó el medio B5 contra los otros dos medios de cultivo, se encontró que en los medios SH y MS se produjeron en promedio, menos brotes que en el medio B5.

En la comparación del medio MS contra el medio SH para los dos clones, la diferencia se encontró a favor del medio SH.

En la comparación número tres, se muestra que el número de brotes producidos por el clon A10H2, fue superior que los producidos por el clon A4H3 en ambos medios comparados (SH y MS).

Por último, para el medio B5, la producción de brotes fue mayor en el clon A4H3, es decir, que ese clon, cultivado en medio B5 produce más brotes que el clon A10H2.

### 6.2.3. Análisis de varianza para la variable tamaño de brotes.

Cuadro 8. Análisis de varianza para tamaño de brotes

FV	SC	GL	CM	F	p	F tablas
Tratamientos	4.04613625	37	0.10935503	1.83929586	0.00770815	1.51531 **
Error	6.67778513	114	0.05945484			
Total	10.8239876	151				

\*\* altamente significativo

### 6.2.4. Contrastes ortogonales para la variable tamaño de brotes.

Las comparaciones efectuadas en esta variable fueron:

1. El medio B5 comparado contra los medios SH y MS.
2. Los 2 clones (A4H3, A10H2) cultivados en el medio MS contra los mismos clones (A4H3, A10H2) en el medio SH.
3. El clon A4H3 cultivado en los dos medios (MS,SH) contra el clon A10H2 también cultivado en los dos medios basales (MS,SH)
4. El tratamiento B5 del clon A4H3 contra el tratamiento B5 del clon A10H2
5. El nivel 0,0 del medio B5 contra el nivel 0,0 del medio MS, contra el nivel 0.0 del medio SH.

La matriz de comparaciones solo es ortogonal cuando las comparaciones 1 y 5 son mutuamente excluyentes

Cuadro 9. Prueba de F en los contrastes ortogonales para la variable tamaño de brotes

	ZW	ZW <sup>2</sup>	DW	SC y CM	FC	F 0.05	F 0.01	
1	-7.55902316	57.13883108	35	1.63253803	27.4584547	3.924	6.8259	**
2	-4.80221834	23.061301	36	0.64059169	10.7744247	3.924	6.8259	**
3	-3.2192172	10.3633594	36	0.28787109	4.84184457	3.924	6.8259	*
4	1.16812917	1.364525747	2	0.68226287	11.4753126	3.924	6.8259	**
5	-0.74767229	0.559013852	3	0.18633795	3.13410903	3.924	6.8259	NS
		GL error=	114	CM error	0.05945484			

ZW = valor del contraste

DW = línea ortogonal de la matriz de contrastes

\*\* altamente significativo a p=0.01 \* significativo a p=0.05 NS=No significativo

En el cuadro anterior, puede observarse que se encontraron diferencias altamente significativas para los contrastes 1,2 y 4 y significativa para el contraste 3, mientras que la comparación 4 no fue significativa.

La primera se refiere a la comparación entre B5 y los tratamientos de los otros dos medios de cultivo, resultando una diferencia a favor de los medios SH y MS en donde se produjeron los brotes más grandes que en el medio B5.

En la segunda comparación el resultado muestra que los brotes de mayor tamaño se produjeron en el medio SH comparado con el tamaño de los brotes producidos por los dos clones en el medio MS.

En la comparación del tamaño de brotes que presentó cada clon, independientemente del medio en donde fueron cultivados, se encontró que también fue superior el tamaño de brotes producidos por el clon A10H2.

En la cuarta comparación, se encontró que resultó superior el tamaño de brotes que produjo el clon A4H3 cultivado en el medio B5.

Se realizó también la comparación entre los niveles 0,0 de cada medio basal (B5, MS y SH) y la diferencia encontrada en los datos no fue significativa.

### **6.2.5. Análisis de varianza para la variable origen de los brotes (organogénesis).**

Cuadro 10. Análisis de varianza para organogénesis

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F tablas</i>
Tratamientos	31.7620301	37	0.85843325	2.52924591	9.362E-05	1.51531765**
Error	38.6919238	114	0.33940284			
Total	70.4539539	151				

\*\* altamente significativo

### **6.2.6. Contrastes ortogonales para la variable origen de los brotes.**

Las comparaciones efectuadas en esta variable fueron:

1. Los 2 clones (A4H3, A10H2) cultivados en el medio MS contra los mismos clones (A4H3, A10H2) en el medio SH.

2. El clon A4H3 cultivado en los dos medios (MS,SH) contra el clon A10H2 también cultivado en los dos medios basales (MS,SH)
3. El tratamiento B5 del clon A4H3 contra el tratamiento B5 del clon A10H2
4. El nivel 0,0 del medio B5 contra el nivel 0,0 del medio MS, contra el nivel 0.0 del medio SH.

Cuadro 11. Prueba de F en los contrastes ortogonales para la variable origen de los brotes

	ZW	ZW <sup>2</sup>	DW	SC y CM	FC	F 0.05	F 0.01	
1	-12.2681631	150.507827	36	4.18077296	12.3180258	3.924	6.862	**
2	-17.195345	295.679891	36	8.21333029	24.1993564	3.924	6.862	**
3	1.56398204	2.44603983	2	1.22301992	3.60344632	3.924	6.862	NS
4	4.16372094	17.336572	12	1.44471434	4.25663596	3.924	6.862	*
		GL = 114	CM error	0.33940284				

ZW = valor del contraste

DW = línea ortogonal de la matriz de contrastes

\*\* altamente significativo a p=0.01 \* significativo a p=0.05 NS=No significativo

El medio SH superó al medio MS en producción de brotes organogénicos para los dos clones (comparación número 1) y el clon A10H2 fue más productivo que el A4H3 (comparación número 2).

Según el cuadro anterior, no se encontraron diferencias en la producción de brotes por organogénesis cuando los clones son cultivados en medio B5 (comparación No. 3).

Comparando el nivel 0,0 en todos los medios, se encontró que hubo una diferencia significativa a favor del medio MS, es decir la mayor producción organogénica se tuvo en los tratamientos que tenían MS como medio basal.

### 6.2.7. Análisis de varianza para la variable producción de callo

Cuadro 12. Análisis de varianza para producción de callo

	FV	SC	GL	CM	F	p	Ft
Tratamientos	2.79330728	37	0.07549479	2.43885833	0.00016932	1.51531765	
Error	3.5288668	114	0.03095497				
Total	6.32217408	151					

\*\* altamente significativo

### 6.2.8. Contrastes ortogonales para la variable producción de callo

Las comparaciones efectuadas en esta variable fueron:

1. Los 2 clones (A4H3, A10H2) cultivados en el medio MS contra los mismos clones (A4H3, A10H2) en el medio SH.
2. El clon A4H3 cultivado en los dos medios (MS,SH) contra el clon A10H2 también cultivado en los dos medios basales (MS,SH)
3. El tratamiento B5 del clon A4H3 contra el tratamiento B5 del clon A10H2
4. El nivel 0,0 del medio B5 contra el nivel 0,0 del medio MS, contra el nivel 0.0 del medio SH.

Cuadro 13. Prueba de F en los contrastes ortogonales para la variable producción de callo

	ZW	ZW <sup>2</sup>	DW	SC y CM	FC	F 0.05	F 0.01	
1	0.87224456	0.76081057	36	0.02113363	0.68272157	3.924	6.862	NS
2	-4.25016922	18.0639384	36	0.50177607	16.2098699	3.924	6.862	**
3	0.95351174	0.90918463	2	0.45459231	14.6855993	3.924	6.862	**
4	1.70747126	2.9154581	12	0.24295484	7.84865327	3.924	6.862	**

GL= 111

CM error 0.03130

ZW = valor del contraste

DW = línea ortogonal de la matriz de contrastes

\*\* altamente significativo

NS = No significativo

La comparación entre la producción de callo que tuvieron los dos clones mientras estaban cultivados en MS o en SH, no fue significativa, lo que quiere decir que la producción de callo fue igual en los dos medios y en los dos clones.

El tercer contraste, donde fue comparado el clon A4H3 en el medio B5 contra el clon A10H2 cultivado en el mismo medio, dio como resultado que el clon A4H3, en

ese medio (B5) produce más callo, es decir, la organogénesis resultante, es indirecta.

Por último, el contraste entre el medio B5 y los medios MS y SH en sus niveles originales, es decir, 0,0; muestra que en el medio B5 los dos clones producen menos callo.



### 6.3. Análisis de la superficie de respuesta

Para la optimización de las dosis de N y Ca en cada uno de los medios basales utilizados (MS, SH y B5) se diseñó una superficie de respuesta, como se mencionó en el capítulo de materiales y métodos.

Las ecuaciones que se obtuvieron por el método stepwise, se muestran en el Cuadro 14, éstas fueron utilizadas para ajustar a un modelo la relación probable entre cada variable medida y las cantidades de nitrógeno y calcio utilizadas en cada tratamiento.

Cuadro 14. Modelos de regresión ensayados para el experimento de niveles de N y Ca	
$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_1^2 + \beta_4x_2^2 + \beta_5x_1x_2$	Modelo de dos variables independientes cuadrático con interacción
$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_1^2 + \beta_4x_2^2$	Modelo cuadrático para las dos variables independientes
$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_1^2$	Modelo cuadrático para una de las variables independientes

X<sub>1</sub> = nitrógeno  
X<sub>2</sub> = calcio

En el cuadro 15, se resume el ajuste realizado a cada uno de los modelos en donde se aprecia que en el medio MS es más claro el efecto de N y Ca, mientras que en el medio SH no es así.

Lo anterior sugiere que en el medio SH no pueden ser fácilmente optimizados los niveles de los elementos mencionados, debido principalmente a la variación de los resultados en un mismo nivel de N y Ca, lo que incrementa la suma de cuadrados del error, provocando que algunos parámetros del modelo no sean significativos.

El medio basal B5 no fue incluido en el análisis de la superficie de respuesta, debido a que no solamente se incluyó en su forma original, por no ser suficientes los brotes que se produjeron en los clones utilizados para el experimento.

Cuadro 15. Resumen de los modelos de regresión para variables medidas *in vitro*

MEDIO SH

	Exponentes	A10H2	p	R2	A4H3	p	R2
No. brotes	N,Ca,N2,Ca2	**	0.006299	0.361548	*	0.0464	0.261048
	N,Ca,N2	*	0.021643	0.25736	*	0.0244	0.251369
	N,Ca,N2,Ca2,NCa	*	0.01321	0.367871	NS	0.073	0.274365
Tamaño de brotes	N,Ca,N2,Ca2	NS	0.266281	0.150414	*	0.0326	0.280384
	N,Ca,N2	NS	0.157679	0.147929	*	0.0136	0.280193
	N,Ca,N2,Ca2,NCa	NS	0.317185	0.170765	NS	0.0636	0.282673
Origen (Organogénesis)	N,Ca,N2,Ca2	*	0.019885	0.306199	NS	0.1643	0.184208
	N,Ca,N2	NS	0.128251	0.160415	NS	0.135	0.157331
	N,Ca,N2,Ca2,NCa	*	0.036489	0.314768	NS	0.216	0.201183
Producción callo	N,Ca,N2,Ca2	NS	0.083699	0.226869	NS	0.7547	0.057597
	N,Ca,N2	NS	0.23693	0.122285	NS	0.9986	0.000957
	N,Ca,N2,Ca2,NCa	NS	0.143613	0.230502	NS	0.8271	0.066251

MEDIO MS

No. brotes	N,Ca,N2,Ca2	**	0.0034	0.388907	**	0.0001	0.51412
	N,Ca,N2	**	0.006814	0.312577	**	4E-05	0.509841
	N,Ca,N2,Ca2,NCa	**	0.005474	0.4093	**	0.0001	0.55282
Tamaño de brotes	N,Ca,N2,Ca2	*	0.029227	0.286192	NS	0.3426	0.131271
	N,Ca,N2	*	0.01432	0.277695	NS	0.2422	0.120848
	N,Ca,N2,Ca2,NCa	**	0.00983	0.3822	NS	0.4157	0.147009
Origen (Organogénesis)	N,Ca,N2,Ca2	**	0.004874	0.373111	**	0.0001	0.520466
	N,Ca,N2	*	0.012518	0.284167	**	4E-05	0.510351
	N,Ca,N2,Ca2,NCa	*	0.010616	0.378514	**	1E-04	0.560293
Producción callo	N,Ca,N2,Ca2	NS	0.237869	0.15861	*	0.0443	0.263655
	N,Ca,N2	NS	0.18029	0.13965	NS	0.1559	0.148636
	N,Ca,N2,Ca2,NCa	NS	0.351497	0.162021	**	0.0015	0.464826

\*\* altamente significativo (p=0.01)

NS = No significativo

\* significativo (p=0.05)

### 6.3.1. Ajuste de los modelos en la variable número de brotes

En todos los casos para la variable número de brotes, el modelo cuadrático sin interacción (NCa), es adecuado para explicar el número de brotes en función del N y Ca utilizados, sin embargo, este modelo no resultó con ajuste altamente significativo para el clon A4H3 en el medio SH. En ningún caso, el modelo con interacción (NCa) superó significativamente al modelo sin interacción.

Los coeficientes de determinación múltiple ( $R^2$ ) varían de 0.261 a 0.514 y son significativos ( $p < 0.05$ ), aunque estos valores no son tan altos como es deseable,

esto puede deberse a la variabilidad de la respuesta de los clones dentro de cada nivel ensayado; podría ensayarse otro tipo de superficie de respuesta para ajustar otros modelos o igualmente, buscar otro modelo mecanicista que explique el fenómeno, pero eso rebasa el objetivo del presente trabajo.

Tomando en cuenta que la única variable que no estuvo controlada dentro del trabajo de laboratorio fue el tamaño de corte de los brotes en cada resiembra, la variación total no explicada por los modelos es atribuible a esa variación y a las diferencias genéticas entre los clones usados. Esto es concordante con lo expuesto por Pierik (1987) y George (1993) en relación a que la respuesta morfológica de la planta depende, de la disponibilidad de nutrientes y de su constitución genética.

### **6.3.2. Ajuste de los modelos en la variable tamaño de brotes**

Para esta variable, se aprecia una respuesta inversa entre el material y el medio basal, En el clon A10H2 el tamaño de brotes no se ajustó a ningún modelo ensayado, sin embargo, el mismo material en el medio basal MS se ajustó razonablemente a los modelos con interacción (NCA) y sin interacción.

Por otra parte, el clon A4H3 se ajustó al modelo sin interacción en el medio SH mientras que para el medio MS no se ajustó a ningún modelo.

Los modelos que alcanzaron un mejor ajuste fueron: el modelo con interacción para el clon A10H2 en el medio MS ( $R^2=0.382$ ) y sin interacción para A4H3 en el medio SH ( $R^2=0.280$ ) y A10H2 en MS ( $R^2=0.286$ ).

En este caso, de nuevo se hace patente la posibilidad de que esta respuesta a los diferentes medios sea debida a las características genéticas de los clones. Es posible que las diferencias morfológicas que se presentaron después del proceso de micropropagación, puedan encontrarse también a nivel molecular, de forma parecida a lo encontrado por Infante *et al.* (2003), en *A. fourcroydes*.

### **6.3.3. Ajuste de los modelos en la variable origen de los brotes**

En el caso de esta variable, se cuantificaron los brotes que provenían de organogénesis y de yemas axilares, pero en esta última categoría no se encontró suficiente número de brotes para un análisis, por lo que los resultados se presentan posteriormente en forma descriptiva.

Se puede decir que los modelos sin interacción funcionan adecuadamente para todos los casos en esta variable, con excepción del A4H3 en el medio basal SH en el que ningún modelo resultó significativo ( $R^2=0.52$ ). El ajuste a este modelo, hace evidente que el nitrógeno no interactúa con el calcio para producir yemas axilares ni organogénesis, no obstante, la fuente de nitrógeno es importante para la producción de organogénesis en *A. tequilana*, ya que el medio MS que contiene tanto nitrógeno amoniacal como nitratos, produjo mayor número de brotes organogénicos que el medio SH. Esto es concordante con lo mencionado por George (1993) y por McIntyre (2001) con respecto a que la morfogénesis está influenciada por el nitrógeno.

En el caso de esta variable, se hace de nuevo patente la diferencia entre la constitución genética del clon A10H2 y el clon A4H3, que responden de manera diferente a los medios de cultivo.

Como se mencionó anteriormente, las yemas axilares que se produjeron en los tratamientos utilizados no fueron suficientes para efectuar un análisis; por lo que en el Cuadro 19, se muestra que hay inconsistencias entre los tratamientos y los clones, las filas sombreadas señalan los tratamientos en los que no se produjo ningún brote por yema axilar. No hay relación consistente entre clones y medios; por lo que se puede concluir que la producción de brotes de este tipo puede ser modificada solo utilizando reguladores de crecimiento.

Cuadro 16. Producción total de yemas axilares en dos clones de *A. tequilana* cultivados en tres medios basales

Clones tratamiento	A4H3			A10H2			total
	SH	MS	B5	SH	MS	B5	
1,1	0	0		0	0		0
-1,1	1	0		0	4		5
1,-1	0	0		6	0		6
-1,-1	0	0		6	0		6
0,0	0	0	6	0	0	0	6
0,a	6	0		0	0		6
0,-a	2	1		5	0		8
a,0	0	0		0	0		0
-a,0	5	1		2	0		8

#### **6.3.4. Ajuste de los modelos en la variable producción de callo**

No se encontró modelo que ajustara en ninguno de los casos, a excepción de el clon A4H3 para los modelos sin interacción ( $R^2=0.263$ ) y con interacción ( $R^2=0.464$ ).

Debido a lo anterior puede decirse que en general, la producción de callo de los brotes de agave tequilero, no depende de la cantidad de nitrógeno y calcio que contienen los medios de cultivo aquí estudiados.

#### **6.3.5. Ajuste de los modelos en la variable calidad de los brotes**

Para medir la calidad de los brotes, se hizo referencia a la vitrificación que pudiera presentarse en los tejidos de los mismos, sin embargo, no se presentó esta característica de hiperhidricidad en ninguno de los tratamientos y con ninguno de los clones, por lo que no fue una variable sujeta a análisis estadístico.

**6.3.6 Determinación de niveles óptimos de N y Ca para la variable número de brotes**

Las cantidades de N y Ca para cada clon en cada medio de cultivo, se optimizaron derivando parcialmente las funciones respecto de N y Ca. Los valores obtenidos se muestran en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Dosis óptimas de N y Ca para producción de brotes de dos clones de *A. tequilana* en dos medios basales.

Clon	Medio basal	Dosis óptima (mg/l)			
		Fuente	N	Fuente	Ca
A4H3	SH	KNO <sub>3</sub>	1735.0	CaCl <sub>2</sub>	232.2
		NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	208.3		
	MS	KNO <sub>3</sub>	2042.0	CaCl <sub>2</sub>	379.1
A10H2	SH	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1773.3	CaCl <sub>2</sub>	172.3
		KNO <sub>3</sub>	2115.5		
	MS	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	253.8	CaCl <sub>2</sub>	410.5
		KNO <sub>3</sub>	1324.7		
		NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.5		

Los niveles originales de los medios son:

- MS - 1900 mg/l de KNO<sub>3</sub>, 1650 mg/l de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> y 440 mg/l de Ca Cl<sub>2</sub>.
- SH - 2500 mg/l KNO<sub>3</sub>, 300 mg/l de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 200 mg/l de Ca Cl<sub>2</sub>.

## 6.4 Análisis de varianza de las variables de la etapa de invernadero.

El parámetro tomado antes de la adaptación de las plantas a condiciones de invernadero, fue la relación entre la parte aérea de la planta (brote) y su raíz (root/shoot). En el Cuadro 18 se muestra que las diferencias de proporción raíz/brote en las plantas sometidas a los diferentes tratamientos fueron altamente significativas.

### 6.4.1 Análisis de varianza para la variable proporción raíz/brote

Cuadro 18. Análisis de varianza para proporción raíz/brote

FV	SC	GL	CM	F	P	F tablas
Tratamientos	4.90037585	37	0.13244259	4.80916805	5.2908E-11	1.51531**
Error	3.13951502	114	0.02753961			
Total	8.03989088	151				

\*\* altamente significativo

### 6.4.2 Contrastes ortogonales para la variable proporción raíz/brote

Las comparaciones efectuadas en esta variable fueron:

1. Los 2 clones (A4H3, A10H2) cultivados en el medio MS contra los mismos clones (A4H3, A10H2) en el medio SH.
2. El clon A4H3 cultivado en los dos medios (MS,SH) contra el clon A10H2 también cultivado en los dos medios basales (MS,SH)
3. El tratamiento B5 del clon A4H3 contra el tratamiento B5 del clon A10H2
4. El nivel 0,0 del medio B5 contra el nivel 0,0 del medio MS, contra el nivel 0.0 del medio SH.

Los contrastes ortogonales muestran las diferencias encontradas tanto entre medios como entre clones.

Cuadro 19. Prueba de F en los contrastes ortogonales para la variable proporción raíz/brote

	ZW	ZW2	DW	SC y CM	FC	F 0.05	F 0.01	
1	-6.65419832	44.2783553	36	1.22995431	44.6612903	3.924	6.862	**
2	9.55381844	91.2754469	36	2.53542908	92.0648294	3.924	6.862	**
3	0.19870793	0.03948484	2	0.01974242	0.71687377	3.924	6.862	NS
4	-0.10923732	0.01193279	12	0.0009944	0.03610797	3.924	6.862	NS
			GL = 114	CM error	0.02753961			

ZW = valor del contraste  
 DW = línea ortogonal de la matriz de contrastes  
 \*\* altamente significativo  
 NS= No significativo

De acuerdo a los resultados que se reportan en el cuadro anterior, en el primer contraste se puede observar que en promedio, las plantas cultivadas en el medio SH, tuvieron una mayor relación raíz/brote, es decir que el balance entre el crecimiento de la raíz y el tamaño del brote sugiere de inicio una mayor capacidad para su adaptación a las condiciones de invernadero.

Por otra parte, el siguiente contraste, en el que se comparan los dos clones cultivados en los dos medios básicos SH y MS, se hace patente que las plantas del clon A4H3 cultivadas en cualquier medio, tuvieron en promedio mayor relación raíz/brote, es decir, puede considerarse un clon con mayor capacidad de adaptación al salir del laboratorio.

En el caso de esta variable y según lo reportado en la literatura puede verse de nuevo la influencia de la fuente de nitrógeno en las características que tiene la planta al salir de condiciones de laboratorio, puesto que el medio basal MS incluye dos formas químicas de éste elemento que tienen gran influencia en la diferenciación de los tejidos y en el crecimiento de los mismos, de acuerdo con lo mencionado por George (1993) y por McIntyre (2001).

#### **6.4.3 Análisis de varianza para la variable porcentaje de adaptación**

El análisis de varianza de la variable porcentaje de adaptación se muestra en el siguiente cuadro donde puede observarse que existieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos de N y Ca.

Cuadro 20. Análisis de varianza para porcentaje de adaptación

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F tablas</i>
Tratamientos	2.57359313	37	0.06955657	3.42342342	2.6986E-07	1.51531**
Error	2.31623382	114	0.02031784			
Total	4.88982694	151				

\*\* Altamente significativo



#### 6.4.4 Contrastes ortogonales para la variable porcentaje de adaptación

Las comparaciones efectuadas en esta variable fueron:

1. Los 2 clones (A4H3, A10H2) cultivados en el medio MS contra los mismos clones (A4H3, A10H2) en el medio SH.
2. El clon A4H3 cultivado en los dos medios (MS,SH) contra el clon A10H2 también cultivado en los dos medios basales (MS,SH)
3. El tratamiento B5 del clon A4H3 contra el tratamiento B5 del clon A10H2
4. El nivel 0,0 del medio B5 contra el nivel 0,0 del medio MS, contra el nivel 0.0 del medio SH.

Cuadro 21. Prueba de F en los contrastes ortogonales para la variable porcentaje de adaptación

No.	ZW	ZW <sup>2</sup>	DW	SC y CM	FC	F 0.05	F 0.01	
1	-5.79898987	33.6282835	36	0.93411899	45.9753086	3.924	6.862	**
2	9.9411255	98.8259761	36	2.745166	135.111111	3.924	6.862	**
3	0	0	2	0	0	3.924	6.862	
4	-0.41421356	0.17157288	12	0.01429774	0.7037037	3.924	6.862	NS

GL=111

CM error 0.018385714

ZW = valor del contraste

DW = línea ortogonal de la matriz de contrastes

\*\* altamente significativo

NS= No significativo

Los contrastes ortogonales efectuados para esta variable, muestran una diferencia altamente significativa entre los tratamientos del medio basal SH y MS a favor del SH, en donde se presentó el mayor porcentaje de plantas adaptadas, tomando en conjunto los dos clones. Sin embargo, al comparar cada clon, la diferencia entre porcentaje de adaptación está a favor del clon A4H3 que en promedio tuvo un mayor número de plantas adaptadas en ambos medios de cultivo.

El tercer contraste muestra igualdad de medias, lo que significa que el porcentaje de adaptación es igual para los dos clones en el medio B5.

Por último, el cuarto contraste no presentó diferencias estadísticas significativas.

La variable porcentaje de adaptación es quizá una de los más importantes parámetros para decidir si un medio de cultivo es conveniente en la micropropagación de una especie, por lo que los anteriores resultados muestran que propagar por cultivo de tejidos *A. tequilana* en medio MS, permite tener plantas que se adaptan más fácilmente a las condiciones de invernadero.

#### **6.4.4 Plantas con producción de hoja ex vitro a 30 días de adaptación**

El número de plantas disponibles para obtener los valores de esta variable, no fueron suficientes para el análisis de varianza, por lo que se reportan con estadística descriptiva los conteos de plantas adaptadas en ambos clones en todos los tratamientos.

En la Figura 10 se menciona el número de plantas del clon A4H3 que presentaron crecimiento de la primer hoja producida en condiciones *ex vitro* a los 30 días del establecimiento en invernadero. Así mismo, en la Figura 11 se reportan los datos para el clon A10H2.

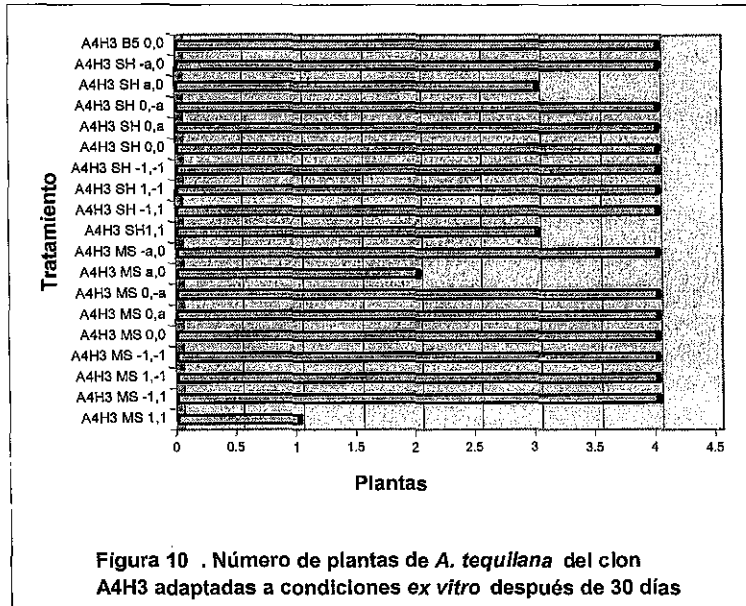
Como se mencionó en el capítulo de materiales y métodos, se utilizaron las cuatro plantas que provenían del experimento *in vitro* por lo que los datos que dan origen a las gráficas de las Figuras 10 y 11 tienen como máximo reportado, cuatro plantas para cada tratamiento.

En la Figura 10 se observa la adaptación de las plantas del clon A4H3 provenientes de todos los tratamientos utilizados. Puede decirse que se tuvo una buena respuesta de adaptación del clon A4H3 en los dos medios en prácticamente todos los tratamientos, teniendo solamente plantas no adaptadas en los tratamientos SH  $\alpha,0$ ; SH 1,1, MS  $\alpha,0$  y MS 1,1. Los niveles 1,1 de cada medio corresponden al incremento al 50% de los niveles originales de los medios (0,0), es decir, las cantidades de N y Ca están incrementadas proporcionalmente.

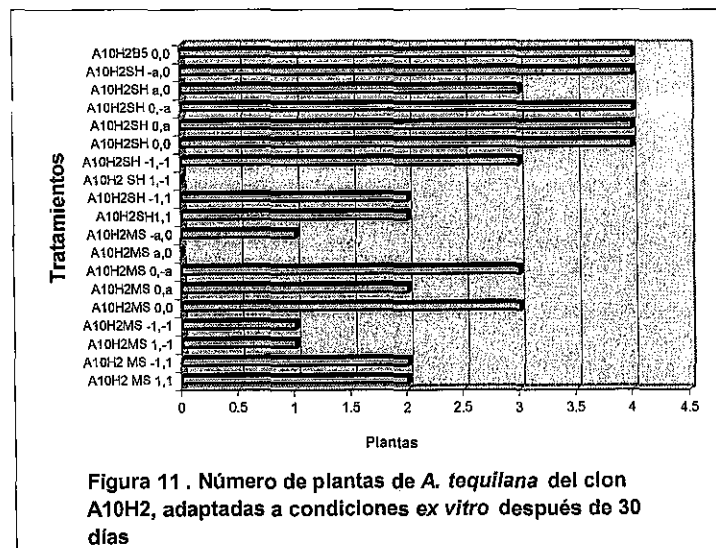
No es posible tener una inferencia sobre la influencia de los tratamientos en la adaptación, puesto que no se cuenta con datos suficientes para realizar análisis de varianza, sin embargo puede notarse que para este caso, los tratamientos con niveles modificados de N ( $\alpha,0$  y 1,1) fueron los que presentaron menor cantidad de plantas adaptadas; lo que puede deberse a la calidad del tejido de la planta, promovido por su cultivo en dichos tratamientos.

Lo anterior es acorde con lo mencionado por Read y Preece (2003) que mencionan que el comportamiento de un explante establecido en cultivo *in vitro*, depende de las condiciones ambientales en las que haya estado la planta madre.

Además de que en el proceso de micropropagación constantes los explantes que originan los clones, se comportan como planta madre.



En lo que se refiere al clon A10H2, el comportamiento fue diferente, ya que en muchos de los tratamientos se encontraron faltantes de plantas, como lo reporta la Figura 11. La pérdida de plantas en los tratamientos no presenta consistencia con los medios ni con los diferentes niveles de N y Ca, por lo que este comportamiento variable puede ser atribuible a la naturaleza fisiológica o genética del clon.



A lo largo del presente trabajo, se han encontrado elementos que permiten inferir sobre la diferente naturaleza de los clones utilizados en los experimentos, es decir, el clon A4H3 tiene un comportamiento muy diferente al clon A10H2, puesto que respondió de manera distinta al cultivo en los diferentes medios basales y en los distintos niveles de N y Ca (tratamientos).

Este comportamiento, de acuerdo con la literatura citada, puede obedecer, o bien al estado de nutrición de la planta madre que originó los explantes, a que las plantas producidas *in vitro* están expuestas a una atmósfera saturada de humedad y esto modifica el comportamiento de los tejidos (Read y Preece, 2003); a que la humedad relativa y la intensidad luminosa afectan la morfología, estructura y densidad de los estomas y esto impide su rápida adaptación; a que una de las principales razones de la pérdida de plantas durante la aclimatación es precisamente el deficiente sistema radicular (Rohr *et al*, 2003), a que la textura cristalina y la calidad de la cera epicuticular en la superficie de las hojas de plantas micropropagadas difiere considerablemente de aquellas que crecen en invernadero o en campo (Enríquez *et al.*, 2000), a que las plantas de agave enraizadas *in vitro* en un medio con bajo contenido de N tienen mayor adaptación y mejor calidad que medio con alto N (Torres-Morán *et al.* 2004<sup>b</sup>) o bien a las características genéticas de los clones (George, 1993).

## **6.5 Variable Peso seco (producción de biomasa)**

En el transcurso de la adaptación de las plantas, uno de los efectos de tratamientos observados fue la pérdida de material vegetal, de modo que los datos fueron insuficientes para el análisis estadístico, por lo que se presentan solo los promedios de cada clon en las figuras 12 y 13.

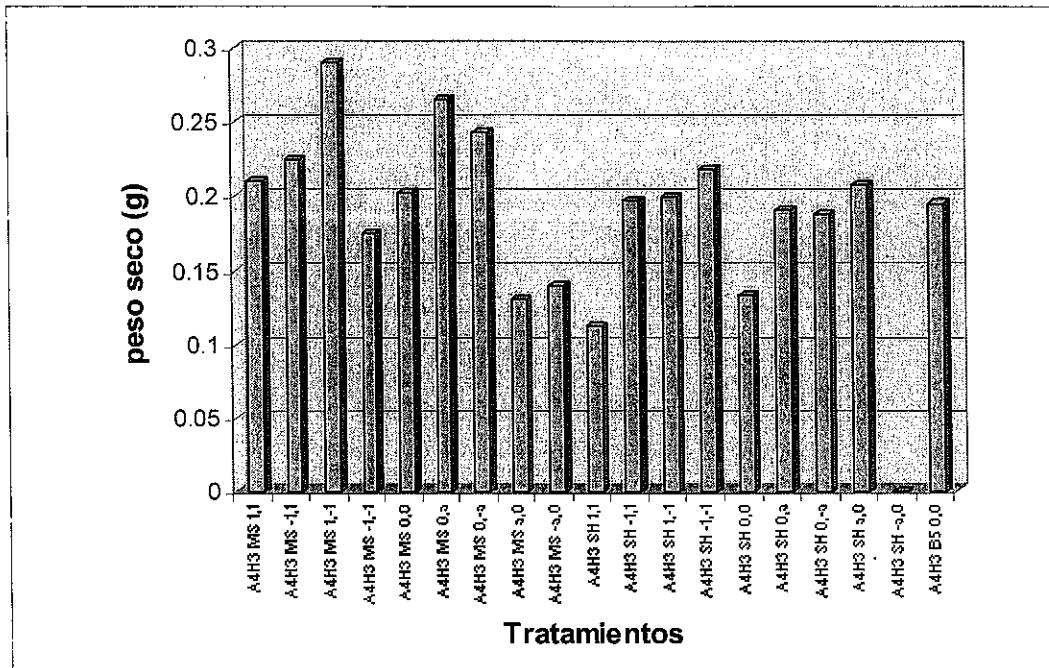


Figura No. 12. Producción de peso seco en plántulas del clon A4H3 provenientes de cultivo *in vitro*.

Como puede observarse, en el clon A4H3 (Figura No.12) el peso seco producido fue menor que en el clon A10H2 (Figura No. 13), ya que éste último presentó valores de hasta 0.460 g, mientras que el clon A4H3 no alcanzó los 0.3 g. Sin embargo, es importante destacar que el mayor número de plantas adaptadas en invernadero y que posteriormente fueron llevadas a peso seco, pertenecen al clon A4H3 que respondió mejor a la adaptación que el clon A10H2, que se desarrolló mejor en el medio SH pero no logró superar el número de tratamientos sobrevivientes para la evaluación de la producción de peso seco que se tuvo en el clon A4H3.

Estos resultados, concuerdan con el hecho de que los materiales son genéticamente diferentes, ya que en las anteriores variables, se observó este comportamiento y es consistente con lo reportado en la literatura acerca de la dependencia de morfogénesis y desarrollo de las plantas con su genotipo.

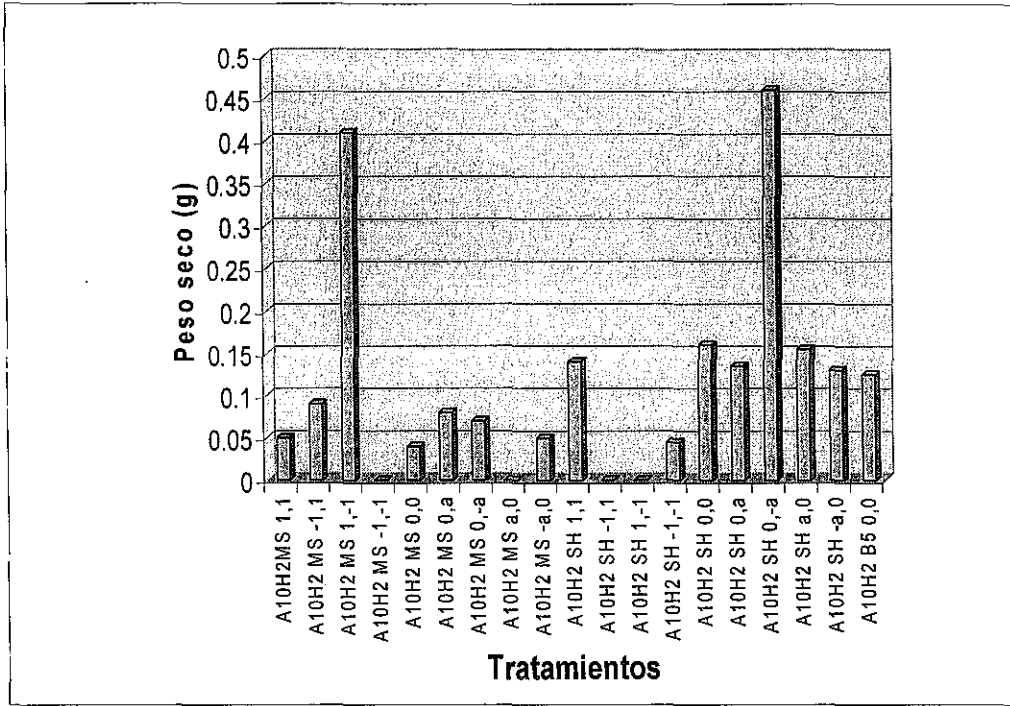


Figura No. 13. Producción de peso seco en plántulas del clon A10H2 provenientes de cultivo *in vitro*.

Los resultados obtenidos, concuerdan con lo reportado por Murashige (1974) acerca de la aclimatación de los cultivos micropropagados, que deben ser preparados previamente *in vitro* para inducir la modificación de sus tejidos y preparar de esa manera su adaptación.

En el clon A10H2, es evidente la influencia del medio basal en su adaptación, puesto que el medio ambiente manejado en invernadero fue igual para el otro clon, que respondió de una manera más satisfactoria en este paso.

## 7. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden mencionar las siguientes conclusiones:

- La producción *in vitro* de brotes de *Agave tequilana* Weber var. azul, no es uniforme en todos los hijuelos que se establecen en laboratorio, probablemente debido a que no se trata de materiales homogéneos fisiológica, morfológica y genéticamente, a pesar de que los hijuelos producidos en campo, provienen de propagación asexual.
- La respuesta de los materiales al medio de cultivo, depende de su genotipo, por lo que podría decirse que los clones A4H3 y A10H2 utilizados para el presente experimento tienen diferente genotipo.
- Los clones A4H3 y A10H2 tuvieron una respuesta muy diferente al medio de cultivo en el que fueron cultivados *in vitro*.
- Las variables producción de brotes, tamaño de brotes, calidad de los brotes (organogénesis) y producción de callo, incrementan su valor dependiendo de la cantidad y fuente de nitrógeno que se les suministre, pero éste elemento no interactúa con el calcio para modificar los valores de esas variables.
- La variabilidad presentada en los datos de las variables medidas *in vitro*, se debe a la constitución genética de los materiales, a la modificación fisiológica o estructural de los tejidos de los clones durante el proceso de micropropagación y al tamaño de corte de los brotes en cada subcultivo.
- La adaptación en invernadero de las plantas de *A. tequilana* propagadas *in vitro*, depende del medio de cultivo en el que fueron propagadas y en el presente trabajo se observó que para el clon A4H3 el mejor medio fue el MS y para el clon A10H2 el SH.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Acram,T., K.Prakash y L. Prakash. 2002. In vitro Plant Breeding. Food Products Press. Binghamton, NY. p:167
2. Binh, L.T., L.T. Muoi, H.T.K. Oanh.T.D. Thang y D.T. Phong. 1990. Rapid Propagation of Agave by *in vitro* Tissue Culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 23: 67-70.
3. Bush, D.S. 1993. Regulation of Cytosolic Calcium in Plants. Plant Physiology. 103:7-13
4. Butenko. P. 1968. Plant Tissue Culture and Plant Morphogenesis. Israel Program for Scientific Translations. Jerusalén: 1:129.
5. Camacho-Cristobal,J.J. y A. González-Fontes. 1999. Boron deficiency causes a drastic decrease in nitrate content and nitrate reductase activity, and increases the content of carbohydrates in leaves from tobacco plants. Springer Link: Planta. 209(4):528-536.
6. Cassells, A.C., S.M.Joyce, E.A. O'Herlihy, M.J. Pérez-Sanz y C.Walsh. 2003. Stress and Quality in *In Vitro* Culture. Acta Hort. 625:153-164, ISHS.
7. Castro-Concha L., Loyola Vargas V.M., J.L. Chan y M. Robert. 1990. Glutamate Dehydrogenase Activity in Normal and Vitrified Plants of *Agave tequilana* Weber Propagated *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 22: 147-151.
8. Cochran, W.G y G. M. Cox. 1980. Diseños experimentales. Trillas. México, D.F.
9. COECyT-SAGARPA. 2002. Programa Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco. Página web [www.coecyt.jalisco.gob.mx](http://www.coecyt.jalisco.gob.mx).
10. Das,T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 31: 253-255.



11. Diario Oficial de la Federación. 1993. Proyecto de Norma Oficial Mexicana, bebidas alcohólicas-tequila-especificaciones. NOM-006SCFI-1993 Tomo CDLXXVI. No.20 México,D.F.
12. Diario Oficial de la Federación. 1994. Proyecto de Norma Oficial Mexicana, NOM-006SCFI-1994. México,D.F. [www.economia-normas.gob.mx](http://www.economia-normas.gob.mx)
13. Diario Oficial de la Federación. 2002. Proyecto de Norma Oficial Mexicana, NOM-EM-037-FITO-2002. Transporte de material-agave. México,D.F. [www.economia-normas.gob.mx](http://www.economia-normas.gob.mx)
14. Enríquez del Valle, J.R., G. Carrillo, P. Sánchez, M. Rodríguez y M. Mendoza. 2000. Fertilización para la optima adaptación y vigor de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) obtenidos *in vitro*. Rev. Fitotec.Mex. 23:59-68.
15. Forde, B.G. y J.A. Cole. 2003. Nitrate Finds a Place in the Sun. Plant Physiology. American Society of Plant Biologists. 131: 395-400.
16. Fucikovskiy Z., L. 2004. Avances de la investigación en el agave tequilero. *Agave tequilana* Weber var. azul y sus principales problemas fitosanitarios. Consejo Regulador del Tequila. p: 147
17. Gamborg, O.L., R.A. Miller y K. Ojima. 1968. Nutrient Requirements of Suspensión Cultures of Soybean Root Cells. Exptl. Cell Res. 50:151-158.
18. George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. In practice. 2° Ed. Exegetics Ltd England. Vol. I y II.
19. Gilroy, S., P.C. Bethke y R.L. Jones. 1993. Calcium homeostasis in plants. Journal of Cell Science. 106: 453-462.
20. Holloway, P.J. 1982. The chemical constitution of plant cutins. P. 45-85. In: The Plant Cuticle. D.F. Cutler, K.L. Alvin y C.E. Price (editors) Academic Press, London.

21. Ildoo H., J. J.F. Harper, F. Liang, y H. Sze. 2000. Calmodulin Activation of an Endoplasmic Reticulum-Located calcium Pump Involves an Interaction with the N-Terminal Autoinhibitory Domain. *Plant Physiology*. 122: 157-168.
22. Infante, D., G. González, L. Peraza-Echeverría, M. Keb-Llanes. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science* 164:223-230
23. Malone, M., P. White y A. Morales. 2002. Mobilization of calcium in glasshouse tomato plants by localized scorching. *Journal of Experimental Botany*. 53(366): 83-88.
24. McIntyre, G.I. 2001. Control of Plant Development by Limiting Factors: A Nutritional Perspective. *Physiologia Plantarum* 113: 165-175.
25. Mes, M., E.G. Groenewald, D.C.J. Wessels, y A. Koeleman. 1977. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (Agavaceae). *Z. Pflanzenphysiol.* 81:369–373.
26. Murashige, T. y L. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 15:473-497.
27. Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25:135-166
28. Nikam, T.D. 1997, High Frequency Shoot Regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 51: 225-228.
29. Nobel, P.S y W.L. Berry. 1985. Element Responses of Agaves. *Amer. J. Bot* 72(5): 686-694.
30. Phillips, G.C. y G.B. Collins. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop. Sci.* 19:59-64.
31. Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. 3a ed. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. pp. 187.
32. Powers, E.D., y R.A., Backhaus. 1989. *In vitro* Propagation of *Agave arizonica* Gentry and Weber. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 16: 57-60.

33. Read, P.E. y J.E. Preece. 2003. Environmental Management for Optimizing Micropropagation. *Acta Hort.* 616:49-58
34. Robert, M.L., J.L. Herrera, F. Contreras y K.N. Scorer. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 8: 37-48.
35. Robert, M.L., J.L. Herrera, J.L. Chan y F. Contreras. 1992. Micropropagation of *Agave* spp. In: Bajaj, Y.P.S. (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* Vol. 19. High-Tech and Micropropagation III. II.9. Springer-Verlag, Berlin.
36. Rodríguez –Garay, B., A. Gutiérrez-Mora y B. Acosta-Dueñas. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 46: 85-87.
37. Rohr, R. I. Iliev, A. Scaltsoyiannes y P. Tsoulpha. 2003. Acclimatization of Micropropagated Forest Trees. *Acta Hort.* 616. ISHS.
38. Roldán, A., 2000. Peligra el tequila ante el SIDA del agave. *Revista electrónica.* <http://www.esmas.com/tecnologia/65476.html>.
39. Santacruz-Ruvalcaba, F., H. Gutiérrez-Pulido y B. Rodríguez–Garay. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 56: 163-167.
40. Schenk, R.U., and A.C. Hildebrandt. 1972. Medium and Techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.
41. Schjoerring, J.K., S. Husted, G. Mäck, y M. Mattsson. 2002. The regulation of ammonium translocations in plants. *Journal of Experimental Botany.* 53(370): 883-890.
42. Steel, L. y P. Torrie. 1985. *Bioestadística: Principios y procedimientos.* McGrawHill. Bogotá, Col. pp 622.
43. Taiz, L y E. Zeiger. 1998. *Plant Physiology.* Second edition. Sinauer Associates Inc. MA. U.S.A. pp.358.

44. Torres-Morán, M. I., M. A. García Vázquez, F. Santacruz-Ruvalcaba, R. Nuño-Romero y J.P. Torres-Morán. 2004<sup>a</sup>. Eficiencia de establecimiento *in vitro* de *Agave tequilana* Weber variedad azul. Memorias del IV Congreso Mexicano y III Latinoamericano y del Caribe de Cactáceas y otras suculentas. p 320.
45. Torres-Morán, M.I., F. Santacruz-Ruvalcaba, L. De la Cruz-Larios, M.A. García-Vázquez, M. García-Contreras, R. Nuño-Romero y J.P. Torres-Morán. 2004<sup>b</sup>. Adaptación de plantas de *Agave tequilana* Weber variedad azul propagadas por cultivo *in vitro*. Bol. Nakari 15(3): edición digital.

# ANEXO

Cuadro 9. Promedios y DMS de la variable Tamaño de brotes

<i>Tratamiento</i>	<b>Promedio</b>		<i>Tratamiento</i>	<b>Promedio</b>	
A10H2SH a,0	1.6477	A	A10H2SH 0,0	1.3050	ABCD
A10H2 MS -1,1	1.5800	AB	A10H2MS -1,-1	1.2735	ABCD
A10H2SH 0,-a	1.5724	ABC	A10H2MS 0,-a	1.2693	ABCD
A10H2SH -1,-1	1.5069	ABCD	A4H3 MS a,0	1.2596	ABCD
A4H3 B5 0,0	1.4969	ABCD	A10H2SH 0,a	1.2442	BCD
A10H2 SH 1,-1	1.4559	ABCD	A4H3 MS 0,0	1.2413	BCD
A10H2SH -a,0	1.4268	ABCD	A4H3 SH -1,-1	1.2238	BCD
A10H2SH -1,1	1.4251	ABCD	A4H3 MS 1,1	1.2215	BCD
A4H3 SH 0,-a	1.4141	ABCD	A10H2B5 0,0	1.2049	BCD
A4H3 MS -a,0	1.4075	ABCD	A10H2MS -a,0	1.1994	BCD
A4H3 SH -a,0	1.4036	ABCD	A10H2MS 0,a	1.1846	BCD
A4H3 MS 0,-a	1.4024	ABCD	A10H2MS 1,-1	1.1533	BCD
A4H3 MS -1,1	1.3935	ABCD	A10H2SH1,1	1.1099	BCD
A4H3 MS 0,a	1.3911	ABCD	A4H3 SH a,0	1.0905	BCD
A4H3 SH -1,1	1.3778	ABCD	A4H3 SH1,1	1.0857	BCD
A4H3 MS -1,-1	1.3744	ABCD	A10H2 MS 1,1	1.0447	CD
A4H3 SH 0,a	1.3571	ABCD	A10H2MS a,0	1.0295	CD
A10H2MS 0,0	1.3454	ABCD	A4H3 MS 1,-1	1.0000	D
A4H3 SH 0,0	1.3250	ABCD	A4H3 SH 1,-1	1.0000	D

DMS 0.05 = 0.52194041

DMS 0.01 = 0.674029

Cuadro 12. Promedios y DMS de la variable origen de los brotes

<i>Tratamientos</i>	<b>Promedio</b>		<i>Tratamientos</i>	<b>Promedio</b>	
A10H2SH 0,0	3.0415	A	A10H2SH1,1	1.6180	BC
A10H2SH 0,-a	2.3672	AB	A4H3 MS 0,-a	1.6160	BC
A10H2SH -1,-1	2.3445	AB	A10H2SH 0,a	1.6124	BC
A10H2MS 0,0	2.3328	AB	A10H2MS 0,-a	1.5956	BC
A10H2SH -a,0	2.3140	AB	A4H3 SH 0,a	1.5454	BC
A4H3 MS -a,0	2.2838	AB	A4H3 SH 0,-a	1.5366	BC
A4H3 SH -1,-1	2.2205	AB	A4H3 MS 0,a	1.4920	BC
A4H3 B5 0,0	2.1330	AB	A10H2MS -a,0	1.4696	BC
A10H2SH -1,1	2.1100	AB	A10H2 SH 1,-1	1.3901	BC
A4H3 MS -1,1	2.0840	AB	A4H3 MS 0,0	1.3901	BC
A10H2 MS -1,1	2.0607	AB	A10H2MS 1,-1	1.3107	BC
A4H3 MS -1,-1	2.0454	AB	A4H3 SH a,0	1.3090	BC
A4H3 SH 0,0	2.0266	AB	A4H3 MS a,0	1.2500	BC
A4H3 SH -1,1	1.9568	AB	A4H3 SH1,1	1.2500	BC
A10H2MS -1,-1	1.9264	AB	A4H3 SH -a,0	1.1830	BC
A10H2B5 0,0	1.7420	BC	A10H2 MS 1,1	1.1830	BC
A10H2SH a,0	1.6991	BC	A10H2MS a,0	1.1036	BC
A10H2MS 0,a	1.6614	BC	A4H3 MS 1,-1	1.0000	BC
A4H3 MS 1,1	1.6526	BC	A4H3 SH 1,-1	1.0000	BC

DMS 0.05 = 1.25172817

DMS 0.01 = 1.61647015

Cuadro 15. Promedios y DMS de la variable producción de callo

<i>Tratamientos</i>	<b>Promedio</b>		<i>Tratamientos</i>	<b>Promedio</b>	
A4H3 MS 1,1	1.8660	A	A4H3 SH a,0	1.5731	ABCD
A4H3 MS 0,0	1.8536	ABC	A10H2MS -a,0	1.5731	ABCD
A4H3 MS -1,-1	1.7990	ABC	A10H2SH1,1	1.5731	ABCD
A10H2SH 0,0	1.7990	ABC	A10H2 MS 1,1	1.5607	ABCD
A10H2SH -a,0	1.7990	ABC	A10H2MS a,0	1.5607	ABCD
A10H2SH -1,1	1.7321	ABCD	A4H3 SH1,1	1.4937	ABCD
A10H2SH a,0	1.7321	ABCD	A4H3 SH 0,a	1.4937	ABCD
A10H2MS 0,-a	1.7196	ABCD	A4H3 SH -a,0	1.4937	ABCD
A10H2MS 1,-1	1.7071	ABCD	A10H2MS 0,0	1.4937	ABCD
A4H3 MS -1,1	1.6526	ABCD	A10H2MS 0,a	1.4937	ABCD
A4H3 B5 0,0	1.6526	ABCD	A4H3 MS 1,-1	1.4142	D
A4H3 SH 0,-a	1.6526	ABCD	A4H3 MS 0,-a	1.4142	D
A10H2SH 0,-a	1.6526	ABCD	A4H3 MS a,0	1.4142	D
A10H2SH -1,-1	1.6401	ABCD	A4H3 SH 1,-1	1.4142	D
A10H2SH 0,a	1.6401	ABCD	A4H3 SH -1,-1	1.4142	D
A10H2MS -1,-1	1.6401	ABCD	A4H3 SH 0,0	1.4142	D
A4H3 MS 0,a	1.5731	ABCD	A10H2 MS -1,1	1.4142	D
A4H3 MS -a,0	1.5731	ABCD	A10H2 SH 1,-1	1.4142	D
A4H3 SH -1,1	1.5731	ABCD	A10H2B5 0,0	1.4142	D

DMS 0.05 = 0.377822038

DMS 0.01 = 0.487915877

Cuadro 22. Promedios y DMS de la variable relación raíz/brote

<i>Tratamientos</i>	<b>Promedio</b>		<i>Tratamientos</i>	<b>Promedio</b>	
A4H3 MS -1,-1	1.7611	A	A10H2SH 0,a	1.3289	CDFG
A10H2SH -a,0	1.6839	AB	A4H3 B5 0,0	1.3158	CDFG
A4H3 SH 0,a	1.5883	ABC	A10H2SH 0,-a	1.2972	CDFG
A4H3 MS 1,-1	1.5833	ABCD	A10H2SH1,1	1.2962	CDFG
A4H3 SH 0,-a	1.5702	ABCD	A10H2B5 0,0	1.2661	CDFG
A10H2SH a,0	1.5262	ABCD	A10H2MS -1,-1	1.2456	CDFG
A4H3 MS 0,-a	1.5150	ABCDE	A4H3 MS a,0	1.2052	EFG
A4H3 MS -1,1	1.5064	ABCDE	A10H2MS 1,-1	1.1736	EFG
A4H3 SH -a,0	1.4571	ABCDEF	A10H2MS 0,a	1.1735	EFG
A4H3 SH 0,0	1.4457	ABCDEF	A10H2MS a,0	1.1717	EFG
A10H2SH -1,-1	1.4320	ABCDEF	A10H2 SH 1,-1	1.1648	FG
A4H3 MS 0,a	1.4210	ABCDEF	A10H2MS 0,-a	1.1616	FG
A10H2SH 0,0	1.4162	ABCDEF	A10H2MS 0,0	1.1502	FG
A4H3 SH 1,-1	1.4061	BCDEFG	A4H3 MS 0,0	1.1243	FG
A4H3 MS -a,0	1.3847	BCDEFG	A4H3 SH a,0	1.1142	FG
A4H3 SH -1,1	1.3775	BCDEFG	A10H2 MS 1,1	1.1094	G
A10H2 MS -1,1	1.3770	BCDEFG	A4H3 MS 1,1	1.0620	G
A4H3 SH1,1	1.3463	BCDEFG	A10H2SH -1,1	1.0553	G
A4H3 SH -1,-1	1.3369	CDFG	A10H2MS -a,0	1.0535	G

DMS 0.05 = 0.34746243 DMS 0.01 = 0.44870976