

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA LA
PROPAGACIÓN MASIVA *in vitro* DE CABUYA AZUL (*Agave
americana* L.) Y CABUYA BLANCA (*Furcraea andina* Trel.)”**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

ORFA HIPATIA CRIOLLO FIGUEROA

SANGOLQUÍ, 25 DE AGOSTO DE 2011

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR:

Orfa Hipatia Criollo Figueroa

COORDINADOR DE LA CARRERA:

Ing. Tatiana Páez

SECRETARIO ACADÉMICO:

Dr. Mario Lozada

SANGOLQUÍ, 25 de Agosto de 2011

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. ORFA HIPATIA CRIOLLO FIGUEROA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA.

25 de Agosto de 2011

Fecha

Msc. Mónica Jadán

Ing. Marco Taipe

REVISADO POR

Ing. Tatiana Páez

DEDICATORIA

A mi abuelita, Elvira, por ser la mejor madre.

Hipatia Criollo Figueroa

AGRADECIMIENTOS

De manera especial a Dios por darme fuerza, salud, esperanza, inteligencia y paciencia en la elaboración y culminación de mi trabajo de las cabuyas.

A mi padre, Gonzalo, por su gran amor, apoyo constante, protección y sus consejos de vida, que me han permitido crecer tanto profesional, como espiritualmente.

A mi madre, Orfa, que a pesar de encontrarse lejos físicamente, sus valores de lucha, esfuerzo y amor, siempre están presentes en mí, impulsándome cada día a seguir adelante.

A mis hermanos y en especial a Daniel, por ser más que un hermano, mi amigo, mi confidente, mi apoyo, gracias ñaño por siempre comprenderme.

A mis queridos abuelitos, tíos, tías, primos y primas, que siempre serán mi gran familia, son los mejores, gracias por apoyarme.

A Carlitos por su perseverancia, cariño y ayuda con mis cabuyas, además a mis preciosas amigas: Yamila, Valeria y Andrea, por apoyarme, escucharme y ser como mis hermanas.

A mis queridos compañeros y amigos de trabajo: Dianita, Santi, Salome, Víctor, Señor Geo, Señor María, Carlita y Jhoana, por todo el cariño, apoyo científico, son el mejor equipo de trabajo.

A la Ing. Jaqueline Benítez, Técnica del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB), y al Dr. Eduardo Morillo, Líder del DNB, por darme la oportunidad de trabajar con ellos, por su colaboración científica y su apoyo en el desarrollo de mi trabajo.

A la Msc. Mónica Jadán y al Ing. Marco Taipe por ser mis tutores, un duro trabajo, pero que con su apoyo y ayuda, he podido culminar el desarrollo de la presente investigación.

A la Escuela Politécnica del Ejército (ESPE) por ser mi casa por casi 6 años en mi formación académica como personal.

A la empresa UYAMA FARM, por su colaboración con la aportación del material vegetal que me permitió realizar el presente estudio.

Y, al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) por darme la oportunidad de trabajar en su Institución y hoy presentarles mi pequeño aporte biotecnológico ante ustedes.

Hipatia Criollo Figueroa

INDICE DE CONTENIDOS

HOJA CARÁTULA	i
HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE DE CONTENIDOS	vii
LISTADO DE TABLAS	x
LISTADO DE FIGURAS.....	xiii
LISTADO DE ANEXOS.....	xv
RESUMEN	xvii
ABSTRACT.....	xviii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	3
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos de la investigación	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Marco teórico	5
1.4.1. Generalidades de las cabuyas	5
1.4.2. Formas de reproducción de las cabuyas	10
1.4.3. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales	11
1.4.4. Micropropagación de las Agaváceas	21
1.5. Sistema de hipótesis o pregunta de investigación.....	28
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.1. Participantes	29
2.2. Zona de estudio	29
2.3. Periodo de investigación	30

2.4.	Diseño experimental y/o estadística aplicada	30
2.4.1.	Etapa I: Establecimiento <i>in vitro</i>	30
2.4.2.	Etapa II: Multiplicación <i>in vitro</i>	31
2.4.3.	Etapa III: Enraizamiento	33
2.5.	Manejo del Experimento	34
2.5.1.	Etapa 0: Fase Preparativa.....	34
2.5.2.	Etapa 1: Establecimiento <i>in vitro</i>	35
2.5.3.	Etapa II: Multiplicación <i>in vitro</i>	39
2.5.4.	Etapa III: Enraizamiento	41
2.5.5.	Análisis económico.....	43
2.6.	Equipos y materiales	44
2.7.	Análisis de datos	45
CAPITULO 3: RESULTADOS		46
3.1.	Etapa I: Establecimiento <i>in vitro</i>	46
3.1.1.	Explantes contaminados	46
3.1.2.	Explantes vivos	48
3.2.	Etapa II: Multiplicación <i>in vitro</i>	50
3.2.1.	Cabuya azul (<i>Agave americana</i>).....	50
3.2.2.	Cabuya blanca (<i>Furcraea andina</i>).....	57
3.3.	Etapa III: Enraizamiento <i>in vitro</i>	62
3.3.1.	Cabuya azul (<i>Agave americana</i> L.)	62
3.3.2.	Cabuya blanca (<i>Furcraea andina</i> Trel.)	67
3.4.	Análisis económico	72
3.4.1.	Cabuya azul.....	72
3.4.2.	Cabuya blanca.....	76
3.5.	Plan de producción.....	80
CAPITULO 4: DISCUSIÓN		83
4.1	Etapa I: Establecimiento <i>in vitro</i>	83
4.1.1	Explantes contaminados	83
4.1.2	Explantes vivos	85
4.2	Etapa II: Multiplicación <i>in vitro</i>	86

4.2.1	Cabuya azul.....	86
4.2.2	Cabuya blanca.....	91
4.3	Etapa III: Enraizamiento in vitro.....	93
4.3.1	Cabuya azul (<i>Agave americana</i>).....	93
4.3.2	Cabuya blanca (<i>Furcraea andina</i>).....	95
4.4	Análisis Económico	96
4.4.1	Cabuya Azul	96
4.4.2	Cabuya blanca.....	97
4.5	Plan de producción.....	98
4.5.1	Cabuya Azul	98
4.5.2	Cabuya blanca.....	99
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES		100
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES.....		103
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA		104

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. Formulación de sales Murashige y Skoog (MS)	13
Tabla 1.2. Propiedades y comparación de esterilizantes superficiales comunes para explantes (Tabla traducida de Chawla, 2004, p. 25)	19
Tabla 1.3. Resumen de protocolos de desinfección en especies de agaváceas	23
Tabla 1.4. Medios de establecimiento utilizado en algunas especies de agaves	24
Tabla 1.5. Sustratos utilizados en la adaptación de especies de la familia <i>Agavaceae</i>	28
Tabla 2.1. Tratamientos para la desinfección <i>in vitro</i> de explantes de cabuya blanca	30
Tabla 2.2. Tratamientos para la desinfección <i>in vitro</i> de explantes de cabuya azul	30
Tabla 2.3. Tratamientos de multiplicación para cabuya blanca	32
Tabla 2.4. Tratamientos de multiplicación para cabuya azul	32
Tabla 2.5. Tratamientos de enraizamiento en cabuya blanca	33
Tabla 2.6. Tratamientos de enraizamiento en cabuya azul	33
Tabla 2.7. Composición de los medios utilizados en la etapa de multiplicación	41
Tabla 2.8. Composición de los medios de enraizamiento para las cabuyas	42
Tabla 2.9. Parámetros para la elaboración del plan de producción de las cabuyas	43
Tabla 2.10. Factores a definir para un plan de producción <i>in vitro</i>	43
Tabla 3.1. Porcentaje de contaminación de las cabuyas en el establecimiento	46
Tabla 3.2. Porcentaje de explantes vivos de cabuya durante el establecimiento	48
Tabla 3.3. Porcentaje de explantes regenerados de cabuya azul	51
Tabla 3.4. Proporción de explantes de cabuya azul con brotes	52
Tabla 3.5. Prueba de Chi-cuadrado entre explantes con brotes de cabuya azul y tratamientos de multiplicación	53
Tabla 3.6. Número de brotes por explante (\bar{x}) de cabuya azul	54
Tabla 3.7. ADEVA realizado para número de brotes en cabuya azul	55
Tabla 3.8. Prueba de Tukey para número de brotes en cabuya azul	55
Tabla 3.9. Longitud promedio de los brotes (mm) de cabuya azul	56
Tabla 3.10. ADEVA para longitud (mm) promedio de los brotes en cabuya azul	57
Tabla 3.11. Porcentaje de explantes regenerados de cabuya blanca	58

Tabla 3.12. Porcentaje de explantes de cabuya blanca con brotes	59
Tabla 3.13. Prueba de Chi-cuadrado para la presencia de brotes en explantes de cabuya blanca y medios de multiplicación	60
Tabla 3.14. Medias del número de brotes por explante de cabuya blanca	60
Tabla 3.15. ADEVA para número de brotes por explante de cabuya blanca	61
Tabla 3.16. Porcentaje de enraizamiento en brotes de cabuya azul	63
Tabla 3.17. Prueba Chi-cuadrado entre presencia de raíz y tratamientos de enraizamiento en cabuya azul	63
Tabla 3.18. Media del número de raíces por tratamiento de enraizamiento en cabuya azul	64
Tabla 3.19. ADEVA para Número de raíces de cabuya azul a los 15 días de cultivo	65
Tabla 3.20. ADEVA para Número de raíces de cabuya azul a los 30 días de cultivo	65
Tabla 3.21. Medias del tamaño de raíz (mm) en cabuya azul	66
Tabla 3.22. ADEVA para tamaño de raíz (mm) en cabuya azul a los 15 días de cultivo ..	67
Tabla 3.23. ADEVA para tamaño de raíz (mm) en cabuya azul a los 30 días de cultivo	67
Tabla 3.24. Porcentaje de enraizamiento en brotes de cabuya blanca	68
Tabla 3.25. Media del número de raíces por tratamiento de enraizamiento en cabuya blanca	69
Tabla 3.26. ADEVA para número de raíces en cabuya blanca en los 15 días de cultivo ...	70
Tabla 3.27. ADEVA para número de raíces en cabuya blanca a los 30 días de cultivo	70
Tabla 3.28. Medias del tamaño de raíz de brotes de cabuya blanca	71
Tabla 3.29. ADEVA para tamaño de raíz (mm) en cabuya blanca a los 15 días de cultivo	71
Tabla 3.30. ADEVA para tamaño de raíz (mm) en cabuya blanca a los 30 días de cultivo	72
Tabla 3.31. Determinación del costo de insumos directos para cabuya azul	73
Tabla 3.32. Determinación del costo de depreciación para los materiales de laboratorio para cabuya azul	74
Tabla 3.33. Determinación del costo de depreciación para maquinarias y equipos para cabuya azul	75

Tabla 3.34. Determinación del costo de suministros de producción para cabuya azul	75
Tabla 3.35. Determinación del costo de mano de obra directa para cabuya azul	75
Tabla 3.36. Determinación del costo de producción para cabuya azul	76
Tabla 3.37. Determinación del costo de insumos directos para cabuya blanca	77
Tabla 3.38. Determinación del costo de depreciación para los materiales de laboratorio para cabuya blanca	78
Tabla 3.39. Determinación del costo de depreciación para maquinarias y equipos para cabuya blanca	79
Tabla 3.40. Determinación del costo de suministros de producción para cabuya blanca ...	79
Tabla 3.41. Determinación del costo de mano de obra directa para cabuya blanca	79
Tabla 3.42. Determinación del costo de producción para cabuya blanca	80
Tabla 3.43. Parámetros para la elaboración del plan de producción de las cabuyas	81
Tabla 3.44. Plan de producción para cabuya azul	82
Tabla 3.45. Plan de producción para cabuya blanca	82

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Planta de Cabuya azul de la empresa UYAMA FARM	6
Figura 1.2. Planta de cabuya blanca de la Empresa UYAMA FARM	8
Figura 2.1. A) Planta madre de cabuya azul (<i>Agave Americana</i>); y B) Material Vegetal de cabuya blanca (<i>F. andina</i>), recolectada en UYAMA FARM	35
Figura 2.2. Explante de cabuya azul listo para el proceso de desinfección	36
Figura 2.3. Explantes de cabuya azul cortados, listos para ser introducidos	38
Figura 2.4. A) Explantes de cabuya blanca en etapa de inducción, y B) Explantes de cabuya azul en multiplicación	40
Figura 2.5. Individualización de brotes de cabuya blanca para enraizamiento	42
Figura 3.1. Porcentaje de contaminación en cabuya azul en la etapa de establecimiento ..	47
Figura 3.2. Porcentaje de contaminación de Cabuya blanca en la etapa de establecimiento	47
Figura 3.3. Porcentaje de explantes vivos de Cabuya azul en la etapa de establecimiento.	48
Figura 3.4. Porcentaje de explantes vivos de Cabuya azul en la etapa de establecimiento	49
Figura 3.5. Explantes de cabuya blanca contaminados y vivos a los 30 días de incubación durante la etapa de establecimiento	49
Figura 3.6. Porcentaje de explantes regenerados de cabuya azul	51
Figura 3.7. Porcentaje de explantes de cabuya azul con brotes	52
Figura 3.8. Grafica del análisis de correspondencias entre explantes de cabuya azul con brotes y los tratamientos de multiplicación en la etapa de multiplicación	53
Figura 3.9. Número promedio de brotes por explante de cabuya azul	54
Figura 3.10. Tamaño promedio de brotes de cabuya azul (mm)	56
Figura 3.11. Porcentaje de explantes de cabuya blanca regenerados	58
Figura 3.12. Porcentaje de explantes de cabuya blanca con brotes	59
Figura 3.13. Número promedio de brotes por explantes de cabuya blanca	60
Figura 3.14. Presencia de raíz en brotes de cabuya azul	63
Figura 3.15. Número de raíces promedio por brote de cabuya azul	64

Figura 3.16. Tamaño promedio de raíz de brotes de cabuya azul (mm)	66
Figura 3.17. Presencia de raíz en brotes de cabuya blanca	68
Figura 3.18. Número de raíz promedio en brotes de cabuya blanca	69
Figura 3.19. Tamaño promedio de raíz de brotes de cabuya blanca (mm)	71

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO 1

Datos experimentales del Establecimiento *in vitro* de *Agave americana*114

ANEXO 2

Datos experimentales del Establecimiento *in vitro* de *Fucraea andina*115

ANEXO 3

Datos experimentales de la Multiplicación *in vitro* de *Agave americana*116

ANEXO 4

Datos experimentales de la Multiplicación *in vitro* de *Fucraea andina*118

ANEXO 5

Datos experimentales del Enraizamiento *in vitro* de *Agave americana*120

ANEXO 6

Datos experimentales del Enraizamiento *in vitro* de *Fucraea andina*121

ANEXO 7

Número de brotes por explante de cabuya blanca en la segunda transferencia (doceava semanas) en la etapa de multiplicación122

ANEXO 8

Fotografías del proceso de micropropagación *in vitro* de las cabuyas123

ANEXO 9

Tabla de contingencia entre Explantes con brotes en cabuya azul y Tratamientos de multiplicación126

ANEXO 10

Tabla de contingencia entre Explantes con brotes de cabuya blanca y Tratamientos de multiplicación127

ANEXO 11.

A) Tabla de contingencia entre Presencia de raíz en cabuya azul y Tratamientos de enraizamiento a los 15 días de cultivo.....128

B) Tabla de contingencia entre Presencia de raíz en cabuya azul y Tratamientos de enraizamiento a los 15 días de cultivo128

ANEXO 12

Cálculos del Análisis de Correspondencia entre Explantes de Cabuya azul con brotes y Tratamientos de multiplicación129

RESUMEN

Las especies *Agave americana* L. y *Furcraea andina* Trel., conocidas comúnmente como cabuyas, pertenecen a la familia *Agavaceae*. Estas plantas son de importancia industrial ya que se las utiliza para la extracción de fibras naturales, para la obtención de bebidas fermentadas y sustancias precursoras de esteroides; por ende su importancia ambiental y económica. Se desarrolló un protocolo para la micropropagación masiva de las cabuyas a partir de ápices caulinares procedentes de rizomas de *Agave americana* L. y de plantas en crecimiento de *Furcraea andina* Trel., resultado de la evaluación de varios procedimientos en las etapas de establecimiento, multiplicación y enraizamiento. En la primera etapa, la desinfección superficial se realizó mediante un pre-tratamiento adicional basado en la inmersión de los explantes primarios en agua, detergente (2gL^{-1}) e hipoclorito de sodio (0,077%) durante 16 horas. Posteriormente, se evaluaron tres tratamientos de desinfección y los ápices caulinares se establecieron en un medio sólido nutritivo sin reguladores de crecimiento por 30 días, donde se obtuvo un rango de contaminación total de 0 a 20%. La máxima inducción de brotes en *Agave americana* L. fue obtenida con 3mgL^{-1} de BA y 1mgL^{-1} de ANA, a la sexta semana de cultivo, obteniendo 11,4 brotes. En *Furcraea andina* Trel. la mejor respuesta fue de 0,33 brotes con 3mgL^{-1} de BA y $0,5\text{mgL}^{-1}$ de ANA. El enraizamiento de los brotes obtenidos *in vitro* se alcanzó en medio M&S con vitaminas suplementado: con 2mgL^{-1} de AIA, con $0,5\text{mgL}^{-1}$ de IBA o sin reguladores de crecimiento, con eficiencia de 80 a 90,91% en *Agave americana* L. y de 100% en *Furcraea andina* Trel., a los 30 d de incubación. Refiriéndose a los resultados, el protocolo de micropropagación para *Agave americana* L., es viable en los términos experimentales aplicados; mientras que para *Furcraea andina* Trel., la etapa de multiplicación presentó bajo rendimiento por lo que requiere se evalúen protocolos con diferentes términos experimentales a los aplicados.

Palabras claves: *Agave americana*, *Furcraea andina*, micropropagación, ápices caulinares.

ABSTRACT

Agave americana L. and *Furcraea andina* Trel., are known commonly like “cabuya”. It belongs Agavaceae family. These species has industrial, environmental and economical importance because are used for fiber extraction, fermented beverages production and steroid precursor substances extraction. It developed a micropropagation protocol to massive production of these plants, from shoot tips of rhizomes of *Agave americana* L. and young plants of *Furcraea andina* Trel., applying some treatments at establishment, shoot proliferation and rooting stages. At first stage, superficial disinfection was made through an additional pre treatment based in primary explants immersion into water with detergent (2 gL^{-1}) plus Sodium Hypochloride (0.077%) mean while 16 hours. After, three disinfection treatments were evaluated and the shoot tips were established on a nutritive solid medium without plant growth regulators, about 30 days. It obtained a contamination range between 0 to 20%. The maximum shoot induction in *Agave americana* L. was obtained with 3 mgL^{-1} of BA and 1 mgL^{-1} of NAA, at the sixth week of culture, obtaining 11.4 shoots. In *Furcraea andina* Trel. the best response was 0.33 shoots with 3 mgL^{-1} of BA and 0.5 mgL^{-1} of NAA. The rooting of shoots was achieved in medium M&S supplemented with vitamins, with 2 mgL^{-1} of IAA or 0.5 mgL^{-1} of IBA or without growth regulators, obtaining efficiency between 80 to 90.91% in *Agave americana* L. and in *Furcraea andina* Trel. an efficiency of 100%, at 30 days of incubation. Referring to the results, the micropropagation protocol for *Agave americana* L. is feasible in experimental terms applied, while for *Furcraea andina* Trel., the shoot proliferation stage present a low performance and therefore requires to evaluate other experimental protocols with different terms to those applied.

Keywords: *Agave americana*, *Furcraea andina*, micropropagation, shoot tip.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Las agaváceas son plantas altas, de tallo simple o ramificado, que poseen a menudo hojas suculentas. Se distribuyen en zonas de clima tropical, subtropical, templado y principalmente en regiones áridas que se encuentran ubicadas desde una altura de 0 hasta 3500msnm (Cerón, 2003).

Esta familia se caracteriza por ser productora de fibras duras que se obtienen de las especies pertenecientes a los géneros *Agave*, *Furcraea*, *Sansevieria* y *Phormium* (León, 1987). La importancia de una economía "verde", ha colocado a las fibras naturales como una alternativa a favor de la disminución de la contaminación que causa la producción de plásticos, ya que estas fibras son un recurso renovable, tienen emisiones neutrales de dióxido de carbono, al procesarlas se crean residuos que puedan ser utilizados en actividades complementarias y son 100% biodegradables (FAO, 2009b).

En el Ecuador, se han reconocido dos especies pertenecientes a la familia *Agavaceae* para la elaboración de fibras: la cabuya azul (*Agave americana* L.) y la cabuya blanca (*Furcraea andina* Trel.) (Macía, 2006). Sin embargo, ciertos agaves también se utilizan en la preparación de bebidas (frescas o fermentadas), como es el caso de *A. americana* L., del cual se obtiene un licor llamado "cháhuar-mishqui", que es utilizado tanto para la alimentación como para medicina tradicional (Paredes, 1959). Mientras que la cabuya blanca es utilizada por los pobladores andinos principalmente en la extracción de fibra de las hojas para la elaboración de bolsos, cuerdas, costales, alfombras. Investigaciones recientes indican la posibilidad de fabricar pulpa y papel a partir de estas plantas (De la Torre *et al.*, 2008; Macía, 2006; Aguilar *et al.*, 2007).

La información sobre la producción mundial de la familia *Agavaceae* no está definida. Existen valores económicos reportados de especies específicas de importancia económica tales como sisal (*Agave sisalana*) y el henequén (*Agave fourcroydes*), cifras estimadas en alrededor de 300 000 toneladas, valoradas en USD 75 millones, donde los

mayores productores son Brasil, Tanzania y Kenia (FAO, 2009a); por otro lado, en México, en el 2010 el consumo de *Agave tequilana* fue de 1015100 toneladas, destinadas al sector tequilero, donde se facturó 1300 millones de dólares (MBW, 2011; CTR, 2011). Según datos de la Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones (CORPEI), en el año 2008, la exportación de cabuya en el Ecuador fue de 17,39 toneladas valoradas en USD 144000, donde los principales productos elaborados fueron cuerdas y cordajes de fibra (CORPEI, 2009).

En nuestro país se ha dado un decrecimiento de los rendimientos por hectárea y del volumen de producción de estas cabuyas como consecuencia de la falta de asistencia técnica en el manejo del cultivo (FAO, 1994), además de la inexistencia de nuevas tecnología que permitan el mejoramiento de estas especies. Otros factores a considerar son el lento crecimiento de los agaves, las bajas tasas de reproducción asexual, la reproducción sexual limitada y los problemas de polinización y viabilidad de las semillas; motivos por lo que los agaves pueden ser difícilmente multiplicados masivamente por métodos convencionales (Domínguez *et al.*, 2008b). De igual manera, el género *Furcraea* raramente produce semillas fértiles, tienen lento crecimiento, con ciclo de vida largo y se propagan a través de bulbillos (Martínez y Pacheco, 2006), por lo tanto al igual que en *Agave* el establecimiento de nuevas plantaciones a gran escala requiere de una multiplicación no convencional.

La propagación *in vitro* de agaváceas ha sido la alternativa para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación, principalmente de aquellas especies de importancia económica y en peligro de extinción (Domínguez *et al.*, 2008b). Desde 1974, existe publicaciones de propagación *in vitro* para ciertas especies del género *Agave* tales como *A. sisalana*, *A. fourcroydes*, *A. atrovirens*, *A. tequilana* y otras; las cuales han sido estudiadas por su importancia económica en la producción de bebidas alcohólicas y fibra (Madrigal *et al.*, 1990). En el género *Furcraea*, se publicó un estudio para la micropropagación de *F. macrophylla* B., en el cual se describe el desarrollo de un procedimiento efectivo para la demanda comercial de esta especie (Martínez y Pacheco, 2006). Los trabajos consultados muestran que el cultivo *in vitro* en especies del género *Agave* y *Furcraea* se ha logrado a

partir de cultivo de meristemos, organogénesis directa e indirecta, ó mediante embriogénesis somática (Domínguez *et al.*, 2008a; Nikan, 1997; Domínguez *et al.*, 2008b).

1.1. Formulación del problema

El cultivo de la cabuya blanca y la cabuya azul ha constituido la fuente económica para las comunidades rurales, que de manera artesanal se han dedicado a la extracción de fibra y al procesamiento del “cháhuar-mishqui”. La falta de asesoramiento tanto en los cultivos, el mejoramiento del material, como en el aprovechamiento integral de estas plantas ha originado el abandono de estos cultivos por parte de los campesinos.

En campo, la propagación convencional en ambas especies no permite una producción a gran escala, debido a que se realiza vegetativamente, en cabuya blanca a través de bulbillos que crecen aproximadamente a los 8 años de vida de la planta y en cabuya azul a través de rizomas, que según Robert *et al.* (2005), un agave produce aproximadamente 25 rizomas durante un periodo de 5 años, lo cual en ambas especie no es conveniente si se desea establecer un cultivo comercial, sin considerar que la propagación tradicional no permite obtener plantaciones uniformes (González *et al.*, 2004). De igual manera, la baja fertilidad de las semillas, sugiere que la propagación sexual tampoco constituye la mejor opción.

A través de esta investigación se desarrollará un protocolo para la producción de plantas *in vitro* de cabuya, la misma que se basa en el “Establecimiento de un protocolo para la propagación masiva *in vitro* de cabuya azul (*Agave americana* L.) y cabuya blanca (*Furcraea andina* Trel.)”.

1.2. Justificación

El cultivo a gran escala de las cabuyas permitiría comercializar sus derivados como fibras duras, bebidas fermentadas y pulpa para la elaboración de papel. Por otro lado, la

siembra de las cabuyas en las zonas áridas y semiáridas del país permitiría el aprovechamiento de aquellas áreas improductivas que no han sido utilizadas por las características del suelo.

El establecimiento de un protocolo para la propagación *in vitro* de cabuya azul y cabuya blanca permitirá obtener un mayor número de plantas en menor tiempo, lo cual no puede ser conseguido por técnicas tradicionales de cultivo, además las plantas de cabuya *in vitro* tendrán características similares a la planta madre, estarán libres de microorganismos y poseerán un sistema radical desarrollado.

En la presente investigación se desarrollará un protocolo para la producción *in vitro* de dos especies para las que no existe la metodología establecida, la cabuya azul y la cabuya blanca, con la finalidad de establecer un procedimiento eficiente para la propagación de estas dos especies, con perspectivas al desarrollo de la producción de agaváceas en el país.

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Establecer un protocolo para la propagación masiva *in vitro* de cabuya azul (*Agave americana L.*) y cabuya blanca (*Furcraea andina Trel.*).

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar protocolos para la desinfección de explantes de cabuya azul y cabuya blanca.
- Evaluar reguladores de crecimiento a diferentes concentraciones que permita obtener la mayor tasa de multiplicación *in vitro* de cabuya azul y cabuya blanca.
- Evaluar medios para el enraizamiento de cabuya azul y cabuya blanca.

- Realizar un análisis económico y plan de producción *in vitro* de cabuya azul y cabuya blanca según los protocolos seleccionados.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Generalidades de las cabuyas

Las cabuyas se ubican en la familia *Agavaceae*, la cual consta de 25 géneros y 637 especies (Judd *et al.*, 2010). En el Ecuador se han identificado 3 géneros (*Ágave*, *Furcraea*, *Yucca*) y 8 especies, que se distribuyen en el clima tropical, subtropical y temperado en las regiones costa, sierra y oriente (Cerón, 2003).

La familia *Agavaceae* es un grupo de plantas angiospermas monocotiledóneas, que poseen hojas rígidas agrupadas en la base del tallo y densamente espiraladas, por lo general estas hojas son carnosas o duras y fibrosas, que pueden ser enteras o con espinas en el margen (Cerón, 2003; Grayum, 2003). La biología reproductiva puede ser iteróparo, es decir se pueden reproducir varias veces, ó semélparos, que producen una sola inflorescencia en su vida y luego mueren (Eguiarte *et al.*, 2000). Las flores se encuentran dispuestas en panículas o racimos y tienen diversidad de polinizadores. El fruto puede ser capsular o baya (Cerón, 2003).

1.4.1.1. Cabuya azul

La cabuya azul pertenece al género *Agave* L. (USDA, 2011), el cual está constituido de 250 a 300 especies (Correa y Bernal, 1989). Los agaves se caracterizan por producir inflorescencia una sola vez y esta puede tardar entre cinco y cuarenta años en florecer, tras lo cual la planta muere y deja vástagos que continúan el crecimiento de la planta (AA.VV., 2006).

En el Ecuador, *Agave americana* Linneo es conocida vulgarmente como “cabuya”, “cabuyo”, “cabuyo negro”, “cabuya negra”, “penco”, “penco negro”, “Yana chahuar”, “chaguarquero”, “cabuya azul”, “pita”, “México”, “sábila dulce” (Correa y Bernal, 1989; De la Torre, 2008).



Figura 1.1. Planta de Cabuya azul de la empresa UYAMA FARM.

1.4.1.1.1. Descripción botánica

La cabuya azul es una hierba perenne de hasta 15m de altura, que está conformada de grandes rosetas acaules de rígidas hojas con margen con espinas. Las hojas son de color gris azulado y tienen una longitud de 1 a 2m por 0,15 a 0,20m de ancho. Además, las hojas poseen una epidermis cuticulizada que está cubierta de una película cerosa, la cual le proporciona a las hojas el color gris opaco. La inflorescencia puede alcanzar de 5 a 10m de alto y está formada de un racimo de 25 a 30 ramas distanciadas. Presenta fruto capsular de 6 cm de longitud por 3 cm de diámetro (AA. VV., 2006; Correa y Bernal, 1989; Gupta, 1995, Paredes, 1959). Según Paredes (1959) el periodo de vegetación dura hasta la floración, el cual es aproximadamente de ocho a diez años.

Agave americana L. crece en las regiones áridas y semiáridas de América del Sur, América Central y en algunas partes de Europa (Gupta, 1995). Esta planta se distribuye geográficamente en los países de la región andina como Bolivia, Colombia, Chile, Ecuador, Panamá, Perú y Venezuela (Correa y Bernal, 1989). En el Ecuador se distribuye en las

provincias de Azuay, Bolívar, Cotopaxi, Imbabura, Los Ríos, Pichincha y Loja (Béjar *et al.*, 2001; Jorgensen & León, 1999).

El origen de *Agave americana* es controversial, ya que según White, citado por Correa y Bernal (1989), este *Agave* es nativo del Ecuador, pero según Howard, citado por Gupta (1995), es originaria de México.

1.4.1.1.2. Compuestos químicos

La especie *Agave americana* constituye una fuente rica de saponinas, compuestos que tienen importancia farmacéutica porque son precursores de medicamentos esteroides tales como hormonas sexuales, corticoides, contraceptivos orales y diuréticos (Martínez, 2001). Reportes indican la presencia de los siguientes compuestos: hecogenina, clorogenina, *Agave saponina C*, glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, gitogenina, rockogenina, mannogenina, agavósidos A-E, agavasaponinas, saponina G, mevalonato kinasa, aminopeptidasa, lisina, leucina, isoleucina y sucrosa; obtenidos del análisis realizados en hojas, flores, escapo y tallo (Correa y Bernal, 1989). Según Paredes (1959), el mayor valor económico de la cabuya reside en la concentración de hecogenina, compuesto base para la obtención de cortisona.

1.4.1.1.3. Usos

Agave americana L. se puede emplear como material en la obtención de fibra para fabricar telas, sacos, canastos e incluso papel (Gupta, 1995). Las hojas, la raíz o la savia han sido empleadas como medicina tradicional para aliviar enfermedades como la ictericia, malestares del hígado o riñón, alivio de úlceras, artritis y tuberculosis, entre otras (Correa y Bernal, 1989). Incluso, estudios recientes de citotoxicidad indican que el extracto de metanol de *Agave americana* es un potente citotóxico en líneas celulares de cáncer de mama (Anajwala *et al.*, 2010).

La savia del tronco de la planta madura se conoce como “cháhuar-mishqui”, que al ser fermentado se denomina “pulque” y cuando es destilado se obtiene una bebida alcohólica (Correa y Bernal, 1989). La planta de cabuya también es de uso ornamental y ambiental, formando parte de cercas vivas y sus residuos, en la elaboración de abonos (Correa y Bernal, 1989; De la Torre *et al.*, 2008).

1.4.1.2. Cabuya blanca

La cabuya blanca pertenece al género *Furcraea* Vent (Trópicos, 2011). Género que consta de especies perennes que están formadas de un tronco que lleva una roseta de hojas, las cuales se forman por un meristema apical donde las hojas continúan alargándose después de que se han separado del uso central; *Furcraea* es muy parecido en estructura y forma a los agaves (León, 1987).



Figura 1.2. Planta de cabuya blanca de la Empresa UYAMA FARM.

Furcraea andina Trelease es también conocida como “cabuya”, “cabuya blanca”, “penco”, “cabuyo blanco”, “penco blanco” (Correa y Bernal, 1989; De la Torre *et al.*, 2008).

1.4.1.2.1. Descripción Botánica

La cabuya blanca es una hierba perenne, xerófita, corpulenta y acaulescente. Presenta un tronco corto, con hojas verdes grisáceas de una longitud de 1 a 1,8 m de largo por 0,10 a 0,15 m de ancho, las cuales exhiben espinas prominentes curvas. Flores blancas con perianto curvado e inflorescencia en panículas terminales. Antes de que se abran las flores, la formación de bulbillos ocurre en los pedúnculos florales entre las flores (Correa y Bernal, 1989; León, 1987).

La cabuya blanca se distribuye en Ecuador, Perú y Bolivia (León, 1987). Según Jorgensen & León (1999), esta planta es nativa de la zona Andina del Ecuador, la cual crece en un rango de 1000 a 3500 msnm en las provincias de Azuay, Chimborazo, Cotopaxi, Chimborazo, Imbabura, Pichincha y Loja (Jorgensen & León, 1999; Béjar *et al.*, 2001).

1.4.1.2.2. Compuestos químicos

Las hojas de esta planta contienen mucílago, azúcares, materias resinosas, potasa, hecogenina y fourcogenina (Correa y Bernal, 1989); como se indicó anteriormente la hecogenina puede ser utilizada en la obtención de cortisona y según Paredes (1959), la cantidad de esta sustancia en cabuya blanca es mayor que en cabuya azul.

1.4.1.2.3. Usos

Furcraea andina Trel. ha sido utilizada como material para la fabricación de fibras a partir de las hojas, estas fibras se utilizan en la elaboración de cuerdas, zapatos, bolsos y alfombras. Los escapos florales se han empleado en la construcción de viviendas, postes, escaleras y corrales para aves. Asimismo, como medicina tradicional, utilizando las hojas, tallos, raíz y la savia de la planta, para calmar traumatismos y quemaduras, en infecciones de úlceras y llagas cancerosas, además de combatir parasitosis externas. En algunas provincias del país además la utilizan como cerca viva (Correa y Bernal, 1989; De la Torre, 2008).

1.4.2. Formas de reproducción de las cabuyas

1.4.2.1. Cabuya azul

La cabuya azul tiene reproducción sexual, a través de semilla localizada en los frutos capsulares, y reproducción vegetativa por medio de la formación de bulbos adventicios que crecen junto a los flores ó a partir de rizomas cundidores que salen de la base de la planta, donde crece una yema que da origen a un hijuelo (Paredes, 1959).

La formación de bulbillos es una de las formas de reproducción vegetativa frecuente en el género *Agave* (León, 1987), sin embargo Gupta (1995) manifiesta que esta especie es no bulbífera en contraste con Paredes (1959).

Con respecto a los rizomas, estos crecen subterráneamente, son cilíndricos, gruesos y sin raíces, que cuando llegan a la superficie en su extremo forman brotes similares a la planta madre. En especies como el sisal (*Agave sisalana*) esto sucede un año después de sembrado, estos brotes son arrancados y utilizados en la propagación vegetativa (León, 1987).

1.4.2.2. Cabuya blanca

La propagación por bulbillos es una forma de reproducción vegetativa, que es muy común en el género *Furcraea*, sin embargo también se multiplican por semilla, a pesar que se producen pocas de ellas en la mayoría de las especies. Los bulbillos se forman en los pedúnculos florales y pueden existir centenares en una planta. (León, 1987; AA.VV., 2006). León (1987) describe a los bulbillos como “plantas en miniatura” ya que su estructura consta de un tallo corto, con unas pocas hojas y algunas raíces, los cuales caen al suelo y enraízan rápidamente una vez que se comienza a secar el tallo florífero.

1.4.3. Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales comprende un grupo de técnicas, que estudia el crecimiento de células, tejidos u órganos de plantas (explante) en un medio artificial aséptico. El término *in vitro*, proviene del latín en vidrio, debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico que contienen el medio artificial, compuesto de una dieta balanceada de nutrientes y reguladores de crecimiento, en condiciones asépticas y ambientales controladas, lo cual permite ejercer un control relativo sobre los procesos morfogénéticos, fisiológicos y bioquímicos que ocurren en el explante en estudio (George *et al.*, 2008; Roca y Mroginski, 1991; Abdelnour y Escalant, 1994).

La totipotencialidad celular, propuesta en 1902 por Haberlandt, y la hipótesis del balance hormonal sugerida por Skoog *et al.* en 1957, constituyen los principios más importantes, según Roca y Mroginski (1991), en los que se fundamentan las técnicas desarrolladas en cultivo de tejidos *in vitro*, donde la totipotencia puede ser definida como la capacidad que tienen las células vegetales para desarrollar plantas completas.

Según Roca y Mroginski (1991) la propagación clonal se puede alcanzar mediante las siguientes vías: 1) cultivo de meristemas, ápices caulinares y yemas axilares, 2) organogénesis directa, 3) organogénesis indirecta, 4) embriogénesis somática, 5) órganos de perennidad; 6) el microinjerto y 7) el cultivo de embriones y esporas. Sin embargo, el cultivo de tejidos meristemáticos permite obtener una rápida multiplicación, manteniendo la constitución genética y se ha aplicado en gran variedad de especies.

Las técnicas de cultivo *in vitro* se han utilizado en el mejoramiento genético, la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, la conservación del germoplasma y en micropropagación, la cual involucra que las plántulas que se producen puedan crecer y ser fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta madre de la cual se derivan (Roca y Mroginski, 1991). La ventaja más importante obtenida por la micropropagación sobre los métodos convencionales es que en un tiempo y espacio relativamente corto, una gran cantidad de plantas pueden ser producidas a partir de un solo individuo pudiéndose obtener

aproximadamente un millón de propágulos en un periodo de seis meses, considerando una tasa de multiplicación de diez yemas axilares a partir de un solo explante (Chawla, 2004).

1.4.3.1. Medio de Cultivo

El medio de cultivo seleccionado dependerá de la especie a ser sembrada, de la técnica de cultivo que se emplee, de la edad y del tipo del explante, debido a que la composición del medio influye en el crecimiento y morfogénesis de los tejidos de la planta. Los principales componentes de la mayoría de medios de cultivo son macro y micro nutrientes (nutrientes inorgánicos), reguladores de crecimiento, vitaminas, fuente de carbonos, suplementos no definidos, agentes gelatinizadores y 95% de agua (Roca y Mroginski, 1991; Trigiano & Gray, 2005).

1.4.3.1.1. Elementos minerales inorgánicos

La vida y el crecimiento de una planta *in vitro* requiere de macro y micro nutrientes combinados y su concentración es dependiente de la especie, donde los elementos requeridos en concentraciones mayores que $0,5\text{mmol.L}^{-1}$ son referidos como macronutrientes y menores que a $0,05\text{mmol L}^{-1}$ como micronutrientes. Los macronutrientes comprenden los elementos: fósforo (P), potasio (K), nitrógeno (N), azufre (S), calcio (Ca), y magnesio (Mg); presentes como sales en el medio y son esenciales para el desarrollo de la planta (Razdan, 2003).

El nitrógeno es un elemento esencial en la molécula de ácidos nucleicos, proteínas, clorofila, aminoácidos, alcaloides y algunas hormonas de plantas, además que influye en el enraizamiento de brotes *in vitro*. La fuente de nitrógeno esta suplida por los iones nitrato y los iones amonio. Entre otras funciones de los macronutrientes tenemos que: el fosforo se encuentra en tejidos de rápido crecimiento en las plantas, el cual es requerido en la fotosíntesis y respiración ya que forma parte de las moléculas de ADN y ATP; mientras que el potasio ayuda en la síntesis de carbohidratos y proteínas, en la normal división celular, promueve el crecimiento meristemático además de tener un rol principal en la homeostasis

celular; de igual manera, el calcio es componente de la pared celular y ayuda en la formación de pectina; igualmente, el magnesio es el elemento central de la clorofila e importante enzima activador; y el azufre es componente de algunas proteínas y promueve el desarrollo de raíz (Sathyanarayana y Varghese, 2007; Yadav y Tyagi, 2006).

Los microelementos como el boro (B), zinc (Zn), manganeso (Mn), cobre (Cu), cobalto (Co), molibdeno (Mo), hierro (Fe), cloro (Cl) y yodo (I), son requeridos en pequeñas cantidades pero son esenciales para el crecimiento de células y tejidos. El hierro es considerado el más importante de los micronutrientes ya que es requerido en la síntesis de clorofila, en las conversiones de energía en la fotosíntesis y respiración, además de formar parte de proteínas (Yadav y Tyagi, 2006; Abdelnour y Escalant, 1994).

Según Trigiano & Gray (2005), el medio Murashige y Skoog (MS) es una mezcla de sales comúnmente usada, debido a que la mayoría de especies reaccionan favorablemente al ser cultivadas en este medio. La composición del medio MS se describe en la tabla 1.1.

Tabla 1.1. Formulación de sales Murashige y Skoog (MS)¹.

Compuestos	mg.L ⁻¹
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
Hierro	
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8

¹ La formulación de sales Murashige y Skoog (MS) fue tomada de Roca y Mroginski (1991).

1.4.3.1.2. Componentes orgánicos

➤ Fuente de carbono

La sacarosa (20-60 g/l) es la fuente de carbono y energía comúnmente utilizada, la cual es esencial para el crecimiento y desarrollo del cultivo, ya que la mayoría de cultivos *in vitro* son incapaces de fotosintetizar de manera efectiva dado la insuficiente organización celular y desarrollo de tejidos, limitado intercambio gaseoso y las menos condiciones óptimas medioambientales. Otros tipos de azúcar utilizados como fuente de carbono son: glucosa, fructuosa, maltosa, galactosa (Roca y Mroginski, 1991; Trigiano & Gray, 2005). Según Bhojwani y Razdan (1996), los azúcares son el principal componente osmótico del medio.

➤ Vitaminas, aminoácidos y suplementos no definidos

Pequeñas cantidades de nutrientes orgánicos pueden mejorar el crecimiento y morfogénesis en plantas *in vitro*, estos pueden ser vitaminas, aminoácidos y suplementos no definidos. Las cantidades requeridas varían en función de la especie y genotipo (George *et al.*, 2008).

Las vitaminas son parte de enzimas o cofactores que interactúan en las funciones metabólicas. La tiamina, el ácido nicotínico, la piridoxina y el mioinositol son las vitaminas más frecuentemente utilizadas, aunque la tiamina (0,1-0,5mg/l) es fundamental en un medio de cultivo ya que está forma parte del metabolismo de los carbohidratos y la biosíntesis de algunos aminoácidos (George *et al.*, 2008; Trigiano & Gray, 2005).

Los suplementos no definidos tales como la caseína hidrolizada, agua de coco (5% a 15%, v/v), jugo de naranja, jugo de uva, puré de banana, extracto de levadura entre otros, son compuestos orgánicos complejos de los que se desconoce su composición específica, causando varias respuestas en los cultivos. Estos suplementos son fuentes de nitrógeno,

ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas, reguladores de crecimiento, en diferentes concentraciones (George *et al.*, 2008; Trigiano & Gray, 2005).

1.4.3.1.3. Reguladores de crecimiento

Los reguladores de crecimiento son moléculas orgánicas, capaces de actuar en las plantas en la expresión de genes, crecimiento y desarrollo, a concentraciones relativamente bajas de aproximadamente 0,01mg/l. Se han identificado cinco grupos de reguladores de crecimiento: auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno y ácido ábscisico. Las clases más importantes usadas para regular el crecimiento y la morfogénesis son las auxinas y citoquininas (George *et al.*, 2008; Trigiano & Gray, 2005).

AUXINAS

El nombre auxina se deriva del griego *auxein*, que significa “aumentar” o “crecer”, dado su función de elongación. Las auxinas pueden ser sintéticas como el ácido naftalenácetico (ANA), ácido dicloro fenoxiacético (2,4-D), ó naturales como el ácido indolácetico (AIA) y ácido indolbutírico (IBA). Las auxinas son reguladores de crecimiento que se encargan de la elongación celular, dominancia apical, formación de raíces adventicias y embriogénesis somática; a concentraciones bajas, generalmente se ve favorecida la iniciación del enraizamiento y a concentraciones altas puede ocurrir la formación de callo. El IBA, AIA y ANA son usadas para enraizamiento y en interacción con una citoquinina para la proliferación de brotes, mientras que el 2,4-D es efectivo para la inducción y producción de callos. De todas las auxinas, el AIA es el menos estable, además usualmente es menos efectivo que el ANA y 2,4-D. Las auxinas en combinación con citoquininas también promueven el crecimiento de callos y de células en suspensión. Generalmente, las monocotiledóneas requieren concentraciones altas de 2,4-D en un rango de 10-50uM para inducción de callos (Trigiano & Gray, 2005).

Las auxinas, naturales o sintéticas, son de bajo peso molecular y están estructuradas de un indol o un anillo aromático. El AIA es producido naturalmente en las plantas siendo su posible precursor el triptófano. Naturalmente, el AIA se sintetiza en los tejidos de rápido crecimiento y división, tales como meristemas apicales, hojas jóvenes, frutos en desarrollo y semillas. El movimiento de las auxinas en las plantas puede ser por un transporte polar, el cual ocurre en las células del parénquima asociadas con el tejidos vascular, y por el floema, transporte de forma no polar (Taiz y Zeiger, 2006).

Según George *et al.* (2008), las auxinas activan o controlan la degradación de proteínas represoras, a través de una vía dependiente de ubiquitina en la Vía de ubiquitinación. La ubiquitina es una proteína que facilita la degradación de proteínas. De esta manera se explica el modo de acción de las auxinas de acuerdo a una regulación multifuncional en el desarrollo de la planta debido a la regulación positiva y negativa de genes que responden a auxina.

CITOQUININAS

La kinetina fue la primera citoquinina aislada. Las citoquininas generalmente utilizadas son zeatina, kinetina (KIN), benciladenina (BA), tidiazuron y 2 isopenteniladenina (2-iP); las cuales son derivados de la adenina o aminopurinas (Sathyanarayana y Varghese, 2007). Las funciones principales de este grupo son promover la división celular y estimular el desarrollo de brotes *in vitro*, además actúan en la formación y desarrollo de callos, inhiben la formación de raíz, estimulan el crecimiento de yemas axilares, inhiben la elongación de los brotes, estimulan la diferenciación de brotes adventicios de callos y órganos y modifican la dominancia apical. De acuerdo a la concentración se puede favorecer uno u otro efecto, de esta manera cuando la concentración es alta (1-10mg/l) estos inducen la formación de brotes adventicios pero se inhibe la formación de raíces (Trigiano & Gray, 2005).

En plantas completas, la raíz sería el sitio principal de biosíntesis de las citoquininas naturales, lo cual fue sugerido debido a la baja tasa de división celular en el centro

quiescente de la raíz probablemente como resultado de una concentración superior a la óptima de citoquininas. Estas se transportan a otras regiones en el xilema. El modo de acción de las citoquininas a nivel molecular no es claramente entendido, pero estaría presente en las moléculas de ARN de transferencia (t-RNA). Además, las citoquininas activan la síntesis de ARN, estimulan la síntesis de proteínas y actúan en la actividad de algunas enzimas (George *et al.*, 2008).

1.4.3.1.4. Agentes gelatinizadores

Según Roca y Mroginski (1991) la efectividad de un cultivo también está dado por el tipo y la concentración del agente gelatinizador. El cual permite al explante estar en contacto con el medio semisólido, ya sea en la superficie o incrustado; comúnmente se ha utilizado agar en un rango de concentración de 0,5% a 1,0% (w/v). La concentración utilizada puede ser crítica para la respuesta del cultivo, ya que un medio bastante blando puede producir hiperhidricidad mientras que un medio demasiado sólido puede causar reducción del crecimiento. El agar es un polisacárido, que consiste de agarosa y agarpectina, las cuales forman geles que contienen cantidades altas de agua (hasta 99,5%); entre otros beneficios, el agar no reacciona con ningún otro componente del medio y no es digerido por las enzimas de los tejidos vegetales (Trigiano & Gray, 2005; Sathyanarayana y Varghese, 2007). Existen otros tipos de agente gelificantes alternativos como agargel, transfergel, phytigel, agarosa y gelrite (Mroginski *et al.*, 2010).

1.4.3.1.5. Potencial de hidrógeno

El potencial de hidrógeno (pH) del medio de cultivo es esencial, generalmente se ajusta el medio a un pH entre 5,3 y 5,8. Valores superiores o inferiores al rango de pH de 4,5 a 7,0, el crecimiento *in vitro* de los explantes puede ser limitado debido probablemente a factores como la inestabilidad de reguladores de crecimiento, la precipitación de sales y iones, y a cambios producidos en la consistencia del agar, ya que en un pH ácido (<4,5), el medio no se solidifica (Trigiano & Gray, 2005).

1.4.3.2. Etapas de la propagación *in vitro*

Según Trigiano & Gray (2005) las 5 etapas para una micropropagación exitosa son:

1.4.3.2.1. Etapa 0: Selección de la planta donadora y preparación

Los problemas asociados con la contaminación en la inoculación de los explantes primarios, su calidad y respuesta *in vitro* están directamente relacionados con las condiciones fisiológicas como fitosanitarias de la planta donadora (Trigiano & Gray, 2005), por lo que Pérez (1998) manifiesta que en la discriminación del material de partida se asegura una correcta selección individual.

1.4.3.2.2. Etapa I: Establecimiento del cultivo aséptico

Es la etapa de iniciación, cuyo objetivo es alcanzar un cultivo axénico y fisiológicamente vigoroso (Pérez, 1998). Los contaminantes microbianos pueden afectar la sobrevivencia del explante, el crecimiento y la tasa de multiplicación, ya que en el medio de cultivo pueden crecer y competir ventajosamente con el explante (Roca y Mroginski, 1991; Trigiano & Gray, 2005).

➤ El Explante

“Un buen explante es aquel cuyas células sobreviven, en una alta proporción, a la descomposición” causada por la desinfección, y “que luego responden eficientemente a las condiciones *in vitro*” (Roca y Mroginski, 1991, p.130).

Su selección debe ser en base al sistema de propagación de la planta. En el caso de especies que se propagan vegetativamente, Roca y Mroginski (1991) manifiesta que la fuente de explantes pueden ser los brotes jóvenes y los ápices meristemáticos. El cultivo de meristemas, ápices caulinares y yemas axilares ha sido y es un buen método para obtener

una rápida multiplicación clonal, además de mantener y multiplicar los materiales genéticos de las especies micropropagadas.

➤ La Desinfección

La desinfección superficial del explante se realiza para evitar el crecimiento de microorganismos, primordialmente hongos y bacterias. Compuesto como: soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, alcohol, yodo, fungicidas, bactericidas, y otros han sido empleados para este proceso. En la Tabla 1.2 se indican algunos de los químicos comúnmente utilizados y su efectividad en la esterilización superficial de explantes descritos por Chawla (2004).

Tabla 1.2. Propiedades y comparación de esterilizantes superficiales comunes para explantes (Tabla traducida de Chawla, 2004, p. 25)

Agente esterilizante	Concentración utilizada	Facilidad de remoción	Tiempo de tratamiento (min)	Observaciones
Hipoclorito de sodio	1-1,4%	+++	5-30	Muy efectivo
Hipoclorito de calcio	9-10%	+++	5-30	Muy efectivo
Peróxido de hidrógeno	10-12%	+++++	5-15	Efectivo
Bromine wáter	1-2%	+++	2-10	Muy efectivo
Nitrato de plata	1%	+	5-30	Efectivo
Cloruro de mercurio	0,01-1%	+	2-10	Satisfactorio
Antibióticos	4-50mg/l	++	30-60	Efectivo

Las características del explante establecerán la concentración y el tiempo de exposición al compuesto (Roca y Mroginski, 1991), por ejemplo se ha observado que la desinfección para explantes tomados de plantas con ápices meristemáticos cubiertos, son más fáciles desinfectar que los explantes de plantas adultas, debido a que por lo general los meristemas cubiertos por hojas jóvenes están asépticos (Pérez, 1998).

1.4.3.2.3. Etapa II: Multiplicación

La proliferación de brotes por parte de los explantes se puede alcanzar con el uso de sustancias reguladoras de crecimiento como componentes de un medio de cultivo previamente establecido (Pérez, 1998). El crecimiento de brotes axilares se logra con la adición de citoquininas, sustancia que inhiben la dominancia del meristemo apical estimulando la formación de brotes axilares (Martínez y Pacheco, 2006; Mejía, 1994).

Para Trigiano & Gray (2005) el tipo y concentración de citoquinina debe ser en base de la tasa de multiplicación, la longitud de los brotes y la frecuencia de la variación genética que se quiera alcanzar, ya que altas concentraciones de citoquininas mejoran la proliferación de brotes, a pesar de que los brotes producidos son usualmente más pequeños y puede presentar hiperhidricidad.

Además, las citoquininas en combinación con auxinas, en algunas especies, podrían o no aumentar la proliferación de brotes laterales. No obstante, otros efectos positivos ha sido mencionados con respecto a la adición de auxinas como la atenuación de la inhibición de las citoquininas sobre la elongación de los brotes, causando el incremento del número de brotes de suficiente tamaño para el enraizamiento (Trigiano & Gray, 2005).

1.4.3.2.4. Etapa III: Enraizamiento

En la etapa de enraizamiento las plántulas deben crecer, desarrollar un seudotallo o tallo con las primeras hojas y formar raíces, ya que constituye una etapa de preparación y endurecimiento de los brotes para ser transferidos exitosamente a suelo e incrementar la sobrevivencia (Pérez, 1998; Trigiano & Gray, 2005).

En esta etapa deben manejarse factores como medios de cultivo simples (Pérez, 1998). Comúnmente en plantas herbáceas el enraizamiento puede ser obtenido en ausencia de reguladores, sin embargo algunas especies leñosas la adición de una auxina es requerido en el medio para aumentar la eficiencia (Trigiano & Gray, 2005).

1.4.3.2.5. Etapa IV: Transferencia e medioambiente natural

Constituye la etapa de aclimatación, endurecimiento y trasplante en suelo en condiciones de invernadero o campo. Las condiciones de un cultivo *in vitro* son diferentes a las del medio ambiente natural, por lo que las plantas necesitan una etapa de aclimatación para adaptarse al nuevo hábitat. En esta etapa se debe controlar parámetros ambientales que permita disminuir la deshidratación y estimular la fotosíntesis en los cultivos (Mroginski *et al.*, 2010).

1.4.4. Micropropagación de las Agaváceas

1.4.4.1. Etapa 0: Selección de la planta madre

La selección de plantas madres en especies del género *Agave* en estudios preliminares ha sido mediante una estricta discriminación del material vegetal, como también de una recolección al azar de plantas con buenas características determinadas visualmente. De esta manera en el henequén (*Agave fourcroydes*), la selección de las plantas madres, se realizó en base a las mejores características agroproductivas, efectuándose una caracterización morfológica de los individuos propagados por vía tradicional, de donde se utilizó como fuente de explante los rizomas de las plantas madre seleccionadas (González *et al.*, 2008).

Mientras que Robert *et al.* (1987) para la micropropagación de henequén utilizó plantas madre que fueron seleccionadas al azar de plantaciones comerciales derivadas de técnicas de propagación vegetativa convencional. Asimismo, en otras especies como *Agave tequilana*, *A. salmiana* y *A. duranguensis*, el material vegetal consistió de brotes colectados de individuos adultos vigorosos de plantaciones de agaves, que visualmente fueron seleccionados (Ramírez *et al.*, 2008).

1.4.4.2. Etapa I: Establecimiento *in vitro* del explante

En estudios realizados en el género *Agave* el explante para la introducción *in vitro* han sido: yemas adventicias (Salazar *et al.*, 2009), semillas (Domínguez *et al.*, 2008a), hojas de vitroplantas (Yépez *et al.*, 2001), secciones de tallo (Madrigal *et al.*, 1990), yemas axilares (Aureoles *et al.*, 2008), hijuelos de rizomas (Santacruz *et al.*, 1999), ápices de rizomas (González *et al.*, 2008) meristemas basales, entre otros; mientras que para el género *Furcraea* se encontró que los ápices caulinares de bulbillos de *F. macrophylla* pueden ser utilizados para la propagación en gran escala de esta especie (Martínez y Pacheco, 2006).

En el género *Agave* y *Furcraea* existen diferentes métodos de desinfección de acuerdo al explante en estudio. En la Tabla 1.3 se indican los compuestos y su tiempo de exposición para la desinfección de explantes como tallos, yemas axilares, rizomas, brotes del tallo y bulbillos.

Todos los pasos de los protocolos de desinfección mencionados, se realizaron en agitación constante y las etapas de lavado, corte e introducción *in vitro* se efectuaron dentro de una cámara de flujo laminar, a diferencia del protocolo descrito por Martínez y Pacheco (2006), donde se hicieron todos los pasos dentro de la cámara.

En algunas trabajos de investigación en el género *Agave*, el material vegetal se ha establecido en macetas que se encuentran en invernaderos, donde las plantas que son la fuente de explantes se desinfectaron con fungicidas y bactericidas de tipo sistémico, como es el caso de *Agave inaequidens* Koch.

Tabla 1.3. Resumen de protocolos de desinfección en especies de agaváceas.

Especie	Fuente de explante	Compuesto y tiempo de exposición	Referencia
<i>Agave ssp.</i>	Tallo	Etanol al 70% por 3min. Hipoclorito de sodio o calcio al 0,6 % por 15min. Tres enjuagues con agua autoclavada.	Madrigal <i>et al.</i> , 1990
<i>Agave inaequidens Koch</i>	Yemas axilares y tejido del tallo	Alcohol al 70% por 3min. Hipoclorito de sodio al 10% por 3-5min. Solución de Á. ascórbico (100ppm) y Á. cítrico (150ppm) por 5min.	Aureoles <i>et al.</i> , 2008
<i>Agave cocui Trelease</i>	Yemas axilares	Etanol 70% por 1min. Hipoclorito de sodio al 2,5% por 5min. Tres lavados con agua destilada esterilizada.	Salazar <i>et al.</i> , 2009
<i>Agave fourcroydes</i>	Rizoma	Solución de antibiótico por 1h y 48h en área aclimatizada. Hipoclorito de sodio 5% (v/v) por 20min. Dos lavados con agua destilada estéril por 10min. Eliminar partes dañadas. Solución de hipoclorito de sodio 2.5%(v/v). Dos lavados con agua destilada estéril por 10min.	González <i>et al.</i> , 2004
<i>A. tequilana, A. salmiana y A. duranguensis</i>	Vástagos	Solución de benomyl por 4h. Tres lavados con agua destilada, un min cada uno. Hipoclorito de sodio al 1.2% más 0,5% de tween 20 por 20min. Cinco lavados con agua destilada estéril.	Ramírez <i>et al.</i> , 2008
<i>A. tequilana</i>	Hijuelos de rizomas	Alcohol de 96 grados por 10 s. Hipoclorito de sodio al 3% más jabón líquido por 10min. Tres lavados con agua estéril.	Santacruz <i>et al.</i> , 1999
<i>Dracaena deremensis</i>	Brotes del tallo	Solución de Á. ascórbico (100ppm) por 30min. Sol. de Agry-gent (2g ^L ⁻¹) y Benlate (2g ^L ⁻¹) por 30min. Etanol al 70% por 1min. Solución de hipoclorito de sodio al 2% más Tween 20 y ácido ascórbico (100ppm) por 20min. Tres lavados con agua destilada estéril.	Blanco <i>et al.</i> , 2004
<i>Agave fourcroydes</i>	Tejido del tallo	Alcohol al 70% por 5min. Hipoclorito de sodio al 1.5% por 35min. Tres lavados con agua destilada estéril después de cada etapa.	Robert <i>et al.</i> , 1987
<i>Agave tequilana</i>	“Piña”	Solución agua detergente por 24 horas, realizando el cambio de esta cada cuatro horas.	Juárez <i>et al.</i> , 2005
<i>Furcraea macrophylla</i>	Bulbillos	Agua destilada estéril más tween 20 por 10min. Alcohol al 70% por 1min. Hipoclorito de calcio al 5% por 25min. Cuatro lavados consecutivos, 3min cada uno.	Martínez y Pacheco, 2006

➤ **Medio de cultivo**

Los medios de cultivo de estudios preliminares para el género *Furcraea* y *Agave* se diferencian de acuerdo al explante y estrategia de propagación clonal. Para estos géneros el medio más utilizado es Murashige and Skoog (M&S) (González *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2008; Salazar *et al.*, 2009; Aureoles *et al.*, 2007). La variación se encuentra en la adición de vitaminas, en la modificación de las fuentes de nitrógeno (Robert *et al.*, 1987; Ramírez *et al.*, 2008) y en los tipos y concentraciones de los reguladores de crecimiento.

En la tabla 1.4, se describen algunos medios de establecimiento *in vitro* usados en la micropropagación de Agaves.

Tabla 1.4. Medios de establecimiento utilizado en algunas especies de agaves.

Componentes	MB1 (mg/l)	MB2 (mg/l)	MB3 (mg/l)	MB4 (mg/l)
Sales MS (1962)	√	√	√	√
L2 vitaminas	---	---	---	√
Sulfato de adenina	80	---	---	---
Tiamina	0.40	1	---	---
Tiamina-HCl	---	---	1	---
Ácido nicotínico	---	1	---	---
Piridoxina-HCl	---	1	---	---
Cisteína	---	---	10	---
Myo-inositol	100	100	100	---
Sacarosa	30	30	30	---
Sucrosa	---	---	---	30
Agar	7	5	8	8
AIB	0,3	---	---	---
BA	10	0, 0,1 y 1	---	---
ANA	---	0, 0,1 y 1	---	---

L2 vitamins (Phillips and Collins, 1979)

MB1= Medio de establecimiento, descrito por Aureoles *et al.* (2008).

MB2= Medio de inducción, descrito por Salazar *et al.* (2009).

MB3= Medio basal, descrito por Roca y Mroginski (1991).

MB4= Medio basal, descrito por Santacruz *et al.* (1999).

El gelificante comúnmente utilizado en ambas especies es el agar, sin embargo también se ha empleado Gelan gum en combinación con 0,1% de agar en *A. tequilana*, *A. salmiana* y *A. duranguensis* (Ramírez *et al.*, 2008), y phytigel en *Agave grijalvensis* (Sánchez *et al.*, 2008).

1.4.4.3. Etapa II: Multiplicación *in vitro*

Santacruz *et al.* (1999), en su estudio “Eficiente propagación *in vitro* de *Agave parrasana* Berger”, analizó la interacción entre la citoquinina BA y la auxina 2,4-D en la proliferación de brotes y encontró que la multiplicación de los brotes no necesitó la adición de auxinas; resultados similares se obtuvo al estudiar *Agave grijalvensis* (Sánchez *et al.*, 2008).

No obstante, en *Agave sisalana* (Vargas y García, 1996) la combinación entre BA y ANA favorece la formación de brotes. De este modo, en otras especies como *A. arizonica*, *A. cantala*, *A. fourcroydes*, *A. schidigera*, *A. victoria-reginae* y *Agave cocui* Trelease, la proliferación de brotes requiere de concentraciones bajas a moderadas de auxinas tales como 2,4-D, IBA y ANA (Santacruz *et al.*, 1999; Yépez *et al.*, 2001).

La citoquinina usada comúnmente para el crecimiento de brotes en especies de *Agave* y *Furcraea* es el BA (Das, 1992; Salazar *et al.*, 2009; Ramírez, 2008; Silos *et al.*, 2007; Martínez y Pacheco, 2006), no obstante la kinetina, TDZ, 2ip, también han sido objeto de investigación en ciertas agaváceas (Domínguez *et al.*, 2008a; Martínez y Pacheco, 2006).

La concentración necesaria de la citoquinina BA en el medio de cultivo, varía de acuerdo a la especie en estudio y su respuesta se manifiesta en base al número y tamaño de los brotes. Así, en *Agave duranguensis* y *Agave oscura*, la máxima respuesta de brotes se presentó a una concentración de 4,44 uM (1mg l⁻¹) de BA en combinación con 0,049uM y 2,46uM de IBA, respectivamente (Ramírez *et al.*, 2008). Sin embargo, en otras especies como *Agave Inaequidens*, a una concentración 10mg l⁻¹ de BA se indujo a un mayor

número de brotes, a pesar de que solo a una menor concentración de 3 mg l^{-1} de BA, las variables: altura de planta, número de hojas y vigor, obtuvieron los mejores resultados (Aureoles *et al.*, 2008).

Con respecto al crecimiento de los explantes, por ejemplo en *Agave cocui* Trelease los meristemas sembrados con 1 mg L^{-1} de BA y ANA mostraron el mayor crecimiento, un mes posterior a la siembra (Salazar *et al.*, 2009). En cuestión a subcultivos, Das (1992) encontró que en *Agave sisalana*, $22,2 \mu\text{M}$ de BA es la concentración necesaria para inducir brotes sin una etapa de callo intermediaria pero que esta concentración debe disminuir para la posterior multiplicación continua de brotes a $2,2 \mu\text{M}$.

Otra citoquinina usada en la multiplicación de las agaváceas es la kinetina. En especies como *A. potatorum* y *Agave Inaequidens*, a una concentración de 3 mg.l^{-1} se observó el mayor número de brotes y la mejor altura de planta (Domínguez *et al.*, 2008a; Aureoles *et al.*, 2008). Además, en el estudio realizado por Martínez y Pacheco (2006), se obtuvo que los porcentajes de ápices caulinares que formaron brotes axilares fueron más elevados cuando se cultivaron en medio suplementado con KIN en concentraciones de $46,47 \mu\text{M}$ y de $32,52 \mu\text{M}$ en combinación con $2,69 \mu\text{M}$ de ANA en la especie *F. macrophylla* Baker.

1.4.4.4. Etapa III: Enraizamiento

Para la familia agavácea se han descrito medios de enraizamiento que están compuestos de un medio basal con la presencia reguladores de crecimiento, tales como el 2,4-D (Robert *et al.*, 1987) ácido indolacético (AIA) y el ácido Indol butírico (IBA) (Martínez y Pacheco, 2006), o en ausencia de los mismo (Domínguez *et al.*, 2008a).

Los estudios preliminares indican que el enraizamiento *in vitro* en el género *Agave* y *Furcraea* no presentan inconvenientes. Algunas especies de agave, tales como: *Agave cocui* Trelease (Salazar *et al.*, 2009), *Furcraea macrophylla* Baker (Martínez y Pacheco, 2006), *Agave parrasana* Berger (Santacruz *et al.*, 1999), *Agave cupreata*, *Agave diformis*,

Agave karwiskii, *Agave obscura* y *Agave potatorum* (Domínguez *et al.*, 2008a), la presencia de raíces se ha logrado en ausencia de reguladores.

El ácido indolacético (AIA) ha sido empleado para la inducción de la raíz en especies como *Agave salmiana* 'Gentry', donde el mayor número de raíces se obtuvo a una concentración de 1,14 μ M (0,2mg l⁻¹) (Silos *et al.*, 2007); y en *Furcraea macrophylla* Baker, la cual presentó 100% de enraizamiento en presencia de esta auxina (Martínez y Pacheco, 2006),

El ácido Indol butírico (IBA) ha sido el regulador de crecimiento más utilizado en la etapa de enraizamiento por especies del género *Agave*, así tenemos: *Agave parrasana* Berger (Santacruz *et al.*, 1999), *Agave grijalvensis* (Sánchez *et al.*, 2008), *Agave cocui* Trelease (Yépez *et al.*, 2001), *Agave angustifolia* (Enríquez del Valle *et al.*, 2005), donde se utilizaron concentraciones que van desde 2,46 a 39,3 μ M. En algunas especies el número de raíces incrementa con la concentración de IBA, como es el caso de *Agave grijalvensis* (Sánchez *et al.*, 2008), mientras que en otras, tales como *Agave parrasana* Berger (Santacruz *et al.*, 1999), no existió diferencia significativa entre varias concentraciones de IBA (0 a 39,3 μ M) con respecto a la presencia de raíz a los 60 días de la iniciación del cultivo.

El enraizamiento también estaría ligado a otros factores diferentes al tipo y concentración del regulador de crecimiento. Estos factores serían: el régimen de luz, las concentraciones de sales en el medio, el tamaño de la planta y la concentración de azúcar (Aureoles *et al.*, 2008; Yépez *et al.*, 2001). De esta forma, Sánchez *et al.* (2008) determinó que el régimen de luz afectó el número de raíces, obteniendo los mejores resultados cuando este era 16/8, mientras que Enríquez del Valle *et al.* (2005) estableció que el número de raíces por brote creció en relación a la concentración decreciente de las sales inorgánicas y la concentración creciente del IBA en el medio de cultivo.

1.4.4.5. Etapa IV: Transferencia final a la etapa de medio ambiente

La etapa de aclimatación en el género *Agave* y *Furcraea* ha sido satisfactorio en la mayoría de los ensayos antes realizados. Se reporta desde un 57% a 100% de sobrevivencia al transferirse en sustrato e invernadero (Yépez *et al.*, 2001; Aureoles *et al.*, 2008)

En el estudio realizado en *Agave Inaequidens* se determinó que la sobrevivencia de las plantas en la etapa de aclimatación depende del tamaño (>4cm) y del número de raíces que posean (Aureoles *et al.*, 2008), aunque también se relacione con la composición y tipo sustrato utilizado, como se observa en la Tabla 1.5. Las plantas enraizadas luego de cultivadas se cubren con bolsas de papel traslucido ó bolsas de plástico cerradas herméticamente por 15 a 21 días (Das, 1992; Aureoles *et al.*, 2008).

Tabla 1.5. Sustratos utilizados en la adaptación de especies de la familia *Agavaceae*.

Especie	Sustrato	Sobrevivencia	Referencia
<i>Agave cocui</i> Trel.	S1: arena	71%	Yépez <i>et al.</i> , 2001
	S2: Turba y arena		
	S3: Turba	57%	
<i>Agave cocui</i> Trel.	Arena, tierra y aserrín de coco (1:1:1)	60%	Salazar <i>et al.</i> , 2009
<i>Agave sisalana</i>	suelo: arena (1:1)	70 – 80%	Das, 1992
<i>Furcraea macrophylla</i>	Cascarilla de arroz molida, arena de río y arena (1:1:1)	94%	Martínez y Pacheco, 2006
<i>Agave Inaequidens</i>	Plantas de tamaño superior a 4 cm, en peat moss (60 %) y perlita (40 %)	100%	Aureoles <i>et al.</i> , 2008

1.5. Sistema de hipótesis o pregunta de investigación

- La cabuya azul y cabuya blanca responden eficientemente a la propagación masiva *in vitro*.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Participantes

El proyecto de investigación se realizó en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en la Estación Experimental Santa Catalina, en las instalaciones del Departamento de Biotecnología, siendo este el departamento auspiciante.

La investigación se desarrollo bajo la dirección del Dr. Eduardo Morillo, Líder del Departamento Nacional de Biotecnología (DNB), y la Ingeniera Jaqueline Benítez, Técnica del DNB. Asimismo, con la colaboración de la Msc. Mónica Jadán, Directora, y el Ingeniero Marco Taipe, codirector del proyecto.

2.2. Zona de estudio

La investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental “Santa Catalina”, ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Mejía, parroquia Cutuglagua, a una latitud de 00°22′00″ S y longitud de 78° 23′00″ W².

El material vegetal utilizado en la investigación fue recolectado en los predios de la empresa UYAMA FARM, ubicados en el cantón Mira al suroeste de la provincia del Carchi. La ciudad de Mira se encuentra a 2450 msnm y tiene una pluviosidad anual de 636 mm.

² Datos proporcionados por la Estación Metereológica Izobamba, perteneciente al Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología (INAMHI), 2010.

2.3. Periodo de investigación

La investigación se realizó en un periodo de 12 meses.

2.4. Diseño experimental y/o estadística aplicada

La investigación se desarrolló en tres etapas: etapa I (establecimiento *in vitro*), etapa II (multiplicación) y etapa III (enraizamiento). Se realizó el mismo diseño para cabuya blanca y cabuya azul, sin embargo se analizaron independientemente.

2.4.1. Etapa I: Establecimiento *in vitro*

La unidad experimental estuvo conformada de un frasco de vidrio de 5,5 cm de diámetro por 6,7 cm de alto, conteniendo un explante (ápice caulinar) de cabuya en 25 ml de Medio Basal Modificado (MBM) descrito por Aureoles *et al.* (2008). Se realizó 10 observaciones por cada tratamiento de desinfección en cada especie. Los tratamientos en la presente etapa se describen en la tabla 2.1 y tabla 2.2.

Tabla 2.1. Tratamientos para la desinfección *in vitro* de explantes de cabuya blanca.

Trat.	Descripción
T1	Desinfección de Cabuya Blanca mediante el protocolo modificado de Aureoles <i>et al.</i> (2008)
T2	Desinfección de Cabuya Blanca mediante el protocolo modificado de Blanco <i>et al.</i> (2004)
T3	Desinfección de Cabuya Blanca mediante el protocolo de Martínez <i>et al.</i> (2006)

Tabla 2.2. Tratamientos para la desinfección *in vitro* de explantes de cabuya azul.

Trat.	Descripción
T1	Desinfección de Cabuya azul mediante el modificado de Aureoles <i>et al.</i> (2007).
T2	Desinfección de Cabuya azul mediante el protocolo modificado de Blanco <i>et al.</i> (2004).
T3	Desinfección de Cabuya azul mediante el protocolo de Martínez <i>et al.</i> (2006).

Las variables que se evaluaron en la presente etapa, se detallan a continuación:

Explantos contaminados: Visualmente se determinó cuales ápices caulinares presentaban contaminación microbiana asignándoles el valor de uno (1) y aquellos que no mostraban estos organismos el valor de cero (0). Se evaluó a los 15 y 30 días de siembra.

Explantos vivos: Por simple inspección se asignó el valor de uno (1) para aquellos explantes que mostraron presencia de tejido sano, y el valor de cero (0) para los que presentaron tejidos necrosados o muerte del explante. Se evaluó a los 15 y 30 días de siembra.

Las variables analizadas fueron consideradas como discretas binarias, su análisis se realizó a través tablas de proporción y gráficos demostrativos.

2.4.2. Etapa II: Multiplicación *in vitro*

En la etapa de multiplicación se probó nueve medios de cultivo para la proliferación de brotes en cabuya blanca y cabuya azul. En ambas especies la unidad experimental estuvo conformada de un frasco de vidrio de 5,6 cm de diámetro por 9,0 cm de alto con 30 ml de medio de multiplicación conteniendo un explante de cabuya.

Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA), el factor de estudio fue el *medio de multiplicación*. El número de observaciones en cabuya azul (*A. americana*) fue de cinco (5), mientras que en cabuya blanca (*F. andina*) fue de seis (6). A continuación se detallan los tratamientos en cabuya azul y en cabuya blanca:

Tabla 2.3. Tratamientos de multiplicación para cabuya blanca.

Tratamiento	Descripción
T1	Cabuya Blanca cultivada en MBM + 1 mgL ⁻¹ BA + 0,5 mgL ⁻¹ de ANA
T2	Cabuya Blanca cultivada en MBM + 3 mgL ⁻¹ BA + 0,5 mgL ⁻¹ de ANA
T3	Cabuya Blanca cultivada en MBM + 1 mgL ⁻¹ BA + 1,0 mgL ⁻¹ de ANA
T4	Cabuya Blanca cultivada en MBM + 3 mgL ⁻¹ BA + 1,0 mgL ⁻¹ de ANA
T5	Cabuya Blanca cultivada en MBM + 1 mgL ⁻¹ KIN + 0,5 mgL ⁻¹ de ANA
T6	Cabuya Blanca cultivada en MBM + 3 mgL ⁻¹ KIN + 0,5 mgL ⁻¹ de ANA
T7	Cabuya Blanca cultivada en MBM + 1 mgL ⁻¹ KIN + 1,0 mgL ⁻¹ de ANA
T8	Cabuya Blanca cultivada en MBM + 3 mgL ⁻¹ KIN + 1,0 mgL ⁻¹ de ANA
T9	Cabuya Blanca cultivada en MBM (Control)

BA: benciladenina; ANA: ácido naftalenacético; KIN: kinetina; MBM: Medio basal modificado.

Tabla 2.4. Tratamientos de multiplicación para cabuya azul.

Tratamiento	Descripción
T1	Cabuya Azul cultivada en MBM + 1 mgL ⁻¹ BA + 0,5 mgL ⁻¹ de ANA
T2	Cabuya Azul cultivada en MBM + 3 mgL ⁻¹ BA + 0,5 mgL ⁻¹ de ANA
T3	Cabuya Azul cultivada en MBM + 1 mgL ⁻¹ BA + 1,0 mgL ⁻¹ de ANA
T4	Cabuya Azul cultivada en MBM + 3 mgL ⁻¹ BA + 1,0 mgL ⁻¹ de ANA
T5	Cabuya Azul cultivada en MBM + 1 mgL ⁻¹ KIN + 0,5 mgL ⁻¹ de ANA
T6	Cabuya Azul cultivada en MBM + 3 mgL ⁻¹ KIN + 0,5 mgL ⁻¹ de ANA
T7	Cabuya Azul cultivada en MBM + 1 mgL ⁻¹ KIN + 1,0 mgL ⁻¹ de ANA
T8	Cabuya Azul cultivada en MBM + 3 mgL ⁻¹ KIN + 1,0 mgL ⁻¹ de ANA
T9	Cabuya Azul cultivada en MBM (control)

BA: benciladenina; ANA: ácido naftalenacético; KIN: kinetina; MBM: Medio basal modificado.

Las variables que se evaluaron en la etapa de multiplicación se definen a continuación:

Explantos regenerados: Se contó el número de explantes regenerados por cada tratamiento a las seis semanas de cultivo. Se asignó el valor de uno (1) cuando el explante estuvo regenerado y de cero (0) cuando este estaba muerto o vitrificado.

Explantos con brotes por tratamiento: Se contabilizó los explantes que presenten brotes por cada tratamiento a las seis semanas de cultivo. Se asignó el valor de uno (1) cuando el explante presentaba brotes y de cero (0) cuando este no los presentaba.

Número de brotes por explante: Visualmente se contabilizó el número de brotes emitidos por explante a las seis semanas de cultivo.

Tamaño promedio de brotes (mm): Se determinó la longitud de los brotes por explante, para ello se utilizó una regla milimetrada y la medida se expresó en milímetros (mm). Se evaluó a sexta semana de cultivo.

2.4.3. Etapa III: Enraizamiento

El diseño experimental fue aplicado para cada especie de manera independiente. En ambas especies la unidad experimental estuvo conformada de un tubo de vidrio de 1,5 cm de diámetro por 15 cm de alto con 5 ml de medio de enraizamiento y un brote de cabuya de una longitud de 3 cm a 12 cm.

Se realizó un diseño completamente al azar (DCA). En cabuya blanca se realizaron 10 observaciones por tratamiento, mientras que en cabuya azul se analizó con diferente número de observaciones por tratamiento. A continuación se detallan los tratamientos implementados en cabuya azul y en cabuya blanca:

Tabla 2.5. Tratamientos de enraizamiento en cabuya blanca.

Tratamiento	Descripción
T1	Cabuya blanca cultivada en MBM
T2	Cabuya blanca cultivada en MBM + 11.42 uM de AIA
T3	Cabuya blanca cultivada en MBM + 2,46uM de IBA

AIA: Ácido indolacético; IBA: Ácido Indol butírico.

Tabla 2.6. Tratamientos de enraizamiento en cabuya azul.

Tratamiento	Descripción
T1	Cabuya Azul cultivada en MBM
T2	Cabuya Azul cultivada en MBM + 11.42 uM de AIA
T3	Cabuya Azul cultivada en MBM + 2,46uM de IBA

AIA: Ácido indolacético; IBA: Ácido Indol butírico.

Las variables evaluadas en la etapa de enraizamiento se describen a continuación:

Plántulas con emisión de raíces: Se contabilizó el número de plántulas que desarrollaron raíces a los 15 y 30 días de haber sido sembrado el brote en medio enraizante.

Longitud de raíz (mm): Se determinó la longitud de la raíz a los 15 y 30 días haber sido sembrado el brote en medio enraizante. Se utilizó una regla milimetrada, y la medida se expresará en milímetros (mm).

Número de raíces: Se contó el número de raíces de cada brote, a los 15 y 30 días de haber sido sembrados.

2.5. Manejo del Experimento

2.5.1. Etapa 0: Fase Preparativa

2.5.1.1. Selección de plantas: Material vegetal

La selección de plantas madre de cabuya azul, se realizó basado en la experiencia de Ramírez *et al.* (2008), donde visualmente se seleccionó individuos adultos vigorosos, las cuales tenían una longitud de 166 cm a 210 cm de alto, con un tamaño de hoja de 120 cm a 156 cm (figura 2.1A). El material vegetal consistió de hijuelos obtenidos de rizomas de aproximadamente un año de edad, de una longitud de aproximadamente de 20 cm a 40 cm de alto.

En la cabuya blanca no hubo elección de plantas madre. El material vegetal se seleccionó visualmente tomando en consideración que sean plantas sanas. La longitud de las plantas fue de aproximadamente 70 a 100 cm de longitud (figura 2.1B). Las plantas recolectadas de ambas cabuyas se colocaron en fundas plásticas, para evitar la deshidratación hasta ser trasladada al invernadero.



Figura 2.1. A) Planta madre de cabuya azul (*Agave Americana*); y B) Material Vegetal de cabuya blanca (*F. andina*), recolectada en UYAMA FARM.

2.5.2. Etapa 1: Establecimiento in vitro

2.5.2.1. Explante primario

Las hojas agrupadas en la base del tallo es una característica típica de las agaváceas (Cerón, 2003), motivo por el cual el procedimiento de corte hasta llegar al explante a ser desinfectado se trabajó de igual manera en ambas especies.

A las plantas de cabuya (*A. americana* y *F. andina*) se les eliminó las hojas verdes y se conservó parte del tallo, hasta obtener un explante de 4 a 6 cm de largo por 1,5 a 2,0 cm de ancho, como se indica en la figura 2.2. Todos los explantes de cabuya se cepillaron por alrededor de 5 minutos en una solución de agua corriente más jabón líquido.



Figura 2.2. Explante de cabuya azul listo para el proceso de desinfección.

2.5.2.2. Pre-tratamiento de desinfección

El material vegetal de campo presentó altos índices de contaminación, por ello se realizó pre-tratamientos preliminares antes de evaluar los tratamientos planteados. El pre-tratamiento de inmersión de los explantes primarios durante toda la noche (aproximadamente 16 horas) en una solución de agua corriente más 2gL^{-1} de detergente, basado en la experiencia de Juárez *et al.* (2005), e hipoclorito de sodio al 0,077%, disminuyó considerablemente la contaminación microbiana, por lo que se seleccionó para el proceso de desinfección.

2.5.2.3. Métodos de desinfección

Los explantes primarios de cabuya blanca y cabuya azul utilizados en esta etapa fueron los sometidos al pre-tratamiento de agua, detergente e hipoclorito de sodio durante una noche. A continuación se describen los tres protocolos de desinfección a evaluarse, utilizados en otras especies de agaváceas:

2.5.2.3.1. Método 1

Protocolo de desinfección modificado descrito por Aureoles *et al.* (2008) para *Agave inaequidensa*. Los explantes se enjabonaron y enjuagaron con agua, jabón, tween 20 y agua estéril. Posteriormente, dentro de la cámara de flujo laminar, se colocaron durante 3 minutos en alcohol al 70%, luego se sumergieron en hipoclorito de sodio al 10% durante 5 minutos y en una solución antioxidante (150mg/L de ácido cítrico y 100mg/L de ácido ascórbico) durante 5 minutos. Finalmente los explantes fueron enjuagados tres veces en agua estéril.

2.5.2.3.2. Método 2

Protocolo modificado descrito por Blanco *et al.* (2004) para la especie *Dracaena deremensis*. Las plantas de cabuya fueron lavadas en una solución de 100mgL⁻¹ de ácido ascórbico durante 30 min. Posteriormente se sumergieron en una solución bactericida (214mgL⁻¹ de sulfato de gentamicina y 646mgL⁻¹ de clorhidrato de oxitetraciclina) y fungicida (2 gL⁻¹ de benomilo) durante 30 minutos, luego los explantes se colocaron etanol al 70% durante un minuto y en una solución de NaOCl al 2% con una gota de tween-20 más 100mgL⁻¹ de ácido ascórbico, por 20 min. A continuación, los explantes fueron lavados 3 veces con agua destilada estéril dentro de una cámara de flujo laminar. Se realizó agitación constante en todos los pasos del protocolo.

2.5.2.3.3. Método 3

Protocolo de desinfección descrito por Martínez y Pacheco (2006) para *Furcraea macrophylla* Baker. Dentro de la cámara de flujo laminar, los explantes fueron sumergidos en una solución de agua destilada estéril más tween 20 (0,5ml por 100ml) durante 10 minutos, con agitación continua. Posteriormente, se colocaron en alcohol al 70% por 1 minuto, luego en hipoclorito de calcio al 5%, por 25 minutos, y finalmente se enjuagó cuatro veces consecutivas. Cada enjuague durante 3 minutos, con agua estéril.

Los explantes, posiblemente desinfectados por los métodos aplicados, fueron cortados dentro de una cámara de flujo laminar con un bisturí (mango Nro. 7), eliminando algunas hojas en desarrollo y parte del tallo lastimado por los agentes desinfectantes, hasta obtener un ápice caulinar (explante) de 1,5 a 2,0 cm de longitud, metodología sugerida por Benítez³ y desarrollada en *Agave fourcroydes* por González *et al.* (2004). En la figura 2.3 se puede observar tres explantes cortados, donde A y B, son los explantes introducidos en el medio de cultivo, mientras que C es desechado.

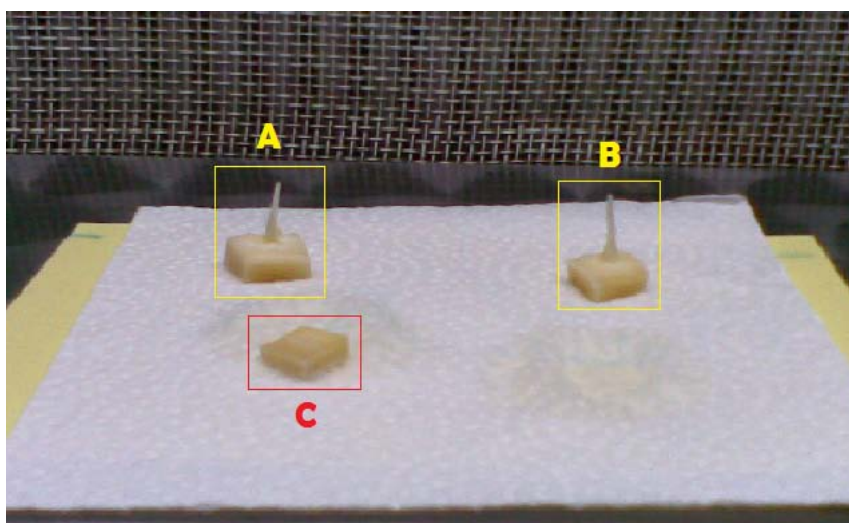


Figure 2.3. Explantes de cabuya azul cortados, listos para ser introducidos.

2.5.2.4. Medio de Introducción

Los explantes se cultivaron en un medio basal modificado (MBM) descrito por Aureoles *et al.* (2008) para el cultivo de tallo y yemas axilares en *Agave inaequidens* Koch; cuya composición es un medio con sales M&S enriquecido con: 80 mgL⁻¹ de sulfato de adenina, 0,40 mgL⁻¹ de tiamina, 100 mgL⁻¹ de myo-inositol, 0,7% (p/v) de agar y 3% (p/v) de azúcar. Además, el medio fue suplementado con agua de coco tierno (AC), sugerido por Benítez, donde se utilizó una concentración de 5% (v/v), ya que según Roca y Mroginski

³ Técnica del Departamento de Biotecnología, encargada del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Estación Santa Catalina (INIAP).

(1991), se ha observado que niveles bajos de agua de coco (5%-10% v/v), el AC puede interactuar con las auxinas y estimular el crecimiento.

El pH del medio se ajustó a $5,7 \pm 0,1$ (Aureoles *et al.*, 2008) y consecutivamente, se esterilizó en el autoclave a $121,5^{\circ}\text{C}$ y 15 lb de presión durante 20 minutos (Roca y Mroginski, 1991).

2.5.2.5. Condiciones de cultivo

Los explantes introducidos *in vitro* se incubaron a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$, basado en la experiencia Salazar *et al.* (2009), y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Aureoles *et al.*, 2008; Martínez y Pacheco, 2006; Das, 1992). Los explantes permanecieron en incubación 30 días.

2.5.3. Etapa II: Multiplicación *in vitro*

En la etapa de multiplicación se probó nueve medios de cultivo para la proliferación y crecimiento de brotes en cabuya blanca y cabuya azul, donde los explantes inicialmente fueron transferidos a una etapa de inducción.

2.5.3.1. Inducción de los explantes

Los explantes de cabuya (*A. americana* y *F. andina*) introducidos, que no presentaron contaminación microbiana, oxidación y vitrificación, fueron utilizados en la etapa de multiplicación. Cada explante fue podado y se realizó un fino corte en la base del tallo hasta obtener un explante de 2cm a 3cm de longitud. Para realizar los cortes se utilizó un bisturí (mango Nro. 7) y pinzas estériles, proceso que se desarrollo bajo condiciones de flujo laminar.

Los explantes fueron cultivados en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 80 mgL^{-1} de sulfato de adenina, $0,4 \text{ mgL}^{-1}$ de tiamina, 100 mgL^{-1} de myo-inositol, 0,7% de

agar, 3% de azúcar (medio basal descrito por Aureoles *et al.*, 2007), suplementado con 5% de agua de coco, 2 mgL⁻¹ de benciladenina (BA) y 0,1 mgL⁻¹ de ácido indolacético (AIA), sugerido por Benítez. El pH del medio se ajustó a 5,7± 0,1 (Aureoles *et al.*, 2008) y consecutivamente, se esterilizó en el autoclave a 121,5°C y 15 lb de presión durante 20 minutos (Roca y Mroginski, 1991).

El tiempo de activación duro de 30 a 32 días aproximadamente, donde los explantes se incubaron a 28±2°C, basado en la experiencia Salazar *et al.* (2009), y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Aureoles *et al.*, 2007); figura 2.4A.

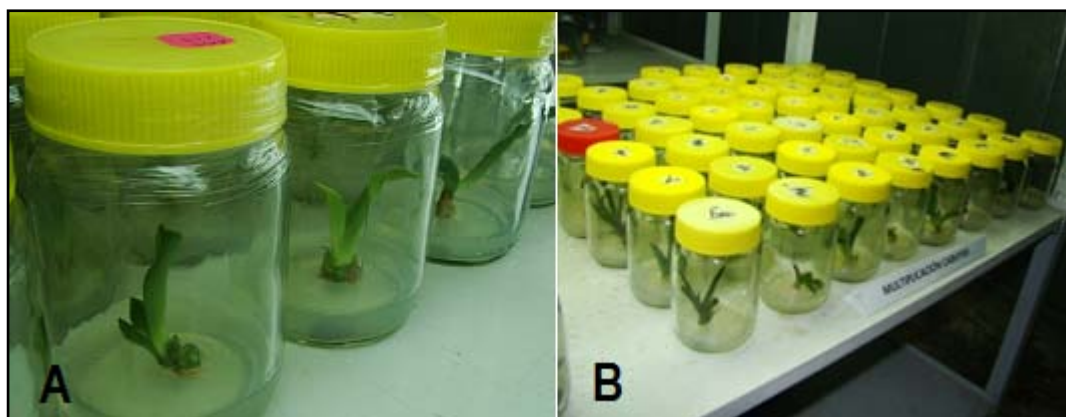


Figura 2.4: A) Explantes de cabuya blanca en etapa de inducción, y B) Explantes de cabuya azul en multiplicación.

2.5.3.2. Multiplicación *in vitro*

En una cámara de flujo laminar, los ápice caulinares de cabuya azul y cabuya blanca activados, se podaron hasta obtener un explante de aproximadamente 1,5 cm a 2,0 cm de longitud, el cual se escindió longitudinalmente por la mitad para cortar el meristemo apical (Sandoval, 1991), obteniéndose dos explantes nuevos que están formados de algunas hojas, una porción de tallo y la mitad del meristemo apical.

Los nuevos explantes fueron colocados en los nueve medios de multiplicación para la inducción y proliferación de brotes, tabla 2.7. El procedimiento fue realizado bajo condiciones de flujo laminar con la ayuda de un bisturí (mango Nro. 7) y pinzas estériles.

Tabla 2.7. Composición de los medios utilizados en la etapa de multiplicación.

REACTIVOS	MEDIOS DE MULTIPLICACIÓN								
	m1	m2	m3	m4	m5	m6	m7	m8	m9
Medio basal Modificado (MBM) descrito por Aureoles <i>et al.</i> (2008) suplementado con AC.	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Reguladores de crecimiento									
BA (mg/l)	1	3	1	3	-	-	-	-	-
KIN (mg/l)	-	-	-	-	1	3	1	3	-
ANA (mg/l)	0.5	0.5	1	1	0.5	0.5	1	1	-

Los explantes de cabuya azul (*Agave americana*) y cabuya blanca (*Furcraea andina*) se incubaron durante 6 semanas, a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, basado en la experiencia Salazar *et al.* (2009), y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Aureoles *et al.*, 2008; Martínez y Pacheco, 2006; Das, 1992), en el cuarto de cultivo (figura 2.4B).

2.5.4. Etapa III: Enraizamiento

Se probó tres medios enraizantes para la cabuya blanca y cabuya azul. Evaluándose el número de plantas con emisión de raíces, la longitud y número de raíces en las plántulas a los 15 y 30 días de cultivo.

2.5.4.1. Enraizamiento

Los brotes de cabuya azul (*Agave americana*), obtenidos de la etapa de multiplicación, de 3,1cm a 12,7cm de longitud, dentro de una cámara de flujo laminar, se individualizaron y cultivaron aleatoriamente en los tres medios enraizantes; en cabuya blanca (*F. andina*) se realizó el mismo procedimiento con la diferencia de que los brotes tenían longitudes de 3,1cm a 6,1cm, como se observa en la figura 2.5.

Los medios enraizantes está compuestos del medio basal modificado (MBM), descrito por Aureoles *et al.* (2007) suplementado con diferentes tipos y concentraciones de

reguladores de crecimiento (IBA y AIA) ó en ausencia de los mismo. Los componentes de los tres medios de enraizamiento se describen en la tabla 2.8.



Figura 2.5. Individualización de brotes de cabuya blanca para enraizamiento.

Tabla 2.8. Composición de los medios de enraizamiento para las cabuyas.

REACTIVOS	MEDIOS ENRAIZANTES		
	Medio 1 (E1)	Medio 2 (E2)	Medio 3 (E3)
Medio de basal modificado, descrito por Aureoles <i>et al.</i> (2008) suplementado con AC.	√	√	√
Reguladores de crecimiento			
AIA (uM)	---	11.42	--
IBA (mg/L)	---	---	0.5

El pH del medio se ajustó a $5,7 \pm 0,1$ (Aureoles *et al.*, 2007) y consecutivamente, se esterilizó en el autoclave a $121,5^{\circ}\text{C}$ y 15 lb de presión durante 20 minutos (Roca y Mroginski, 1991).

Los brotes fueron incubados por 30 días a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ de temperatura, basado en la experiencia Salazar *et al.* (2009), y con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (Aureoles *et al.*, 2007).

2.5.5. Análisis económico

Se aplicó la metodología de costeo por procesos para producción de plantas *in vitro* de cabuya azul y cabuya blanca utilizando los tratamientos más eficientes en las etapas de desinfección, multiplicación y enraizamiento. Para el análisis económico se tomó en cuenta los costos de los materiales directos, los equipos, utensilios, suministros y mano de obra directa e indirecta. También se determinó el costo total de producción y el costo unitario de cada planta de cabuya azul y cabuya blanca.

Igualmente, para el establecimiento del plan de producción se seleccionó los protocolos más eficientes y se realizó de acuerdo a los parámetros y factores indicados en la tabla 2.9 y 2.10, para la elaboración de un plan de producción.

Tabla 2.9. Parámetros para la elaboración del plan de producción de las cabuyas.

PARÁMETROS	
1. Demanda	7. Tasa de inoculación
2. Intervalo de transferencia	8. Tasa de contaminación
3. Tasa de multiplicación	9. Cantidad de mililitros de medio por frasco
4. Producción de vástagos	10. Cantidad de flujos laminares
5. Porcentaje de enraizamiento	11. Número de operadores
6. Tasa de trabajo del operador	12. Número de turnos de trabajo

Tabla 2.10. Factores a definir para un plan de producción *in vitro*.

Semanas	Número de propágulos establecidos	Número de frascos	Número de plantas no contaminadas	Número de plantas a liberar	Número de plantas enraizadas	Número de plantas a multiplicar	Tasa de multiplicación	Número de propágulos
1								
5								
7								

2.6. Equipos y materiales

2.6.1. Material vegetal

- Plantas completas de cabuya azul (*Agave americana* L.) y cabuya blanca (*Furcraea andina* Trel.).

2.6.2. Materiales de campo

- Pala
- Guantes de goma
- Fundas plásticas
- Cinta métrica
- GPS

2.6.3. Materiales de laboratorio

- Material de disección:
Bisturí mango Nro. 7 y
pinzas.
- Mechero Bunsen
- Probetas
- Frascos de vidrio
- Servilletas estériles
- Papel bond estéril
- Papel toalla
- Papel aluminio
- Papel plástico

2.6.4. Equipos de laboratorio

- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Destilador de agua
- Microondas
- Equipo dispensador del medio
- Agitador orbital
- Balanza de precisión
- pH-metro
- Refrigeradora

2.6.5. Reactivos

- Tween 20
- Alcohol potable
- Acido cítrico
- Acido ascórbico
- Agar
- Medio Murashige y Skoog
- Sulfato de adenina
- Tiamina
- Mio-inositol
- Ácido Indol acético (AIA)
- Benciladenina (BA)
- Citoquinina (Kin)
- Ácido naftalenacético (ANA)
- Ácido indol butírico (IBA)

2.7. Análisis de datos

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el paquete estadístico InfoStat versión 2008, además de Microsoft Office Excel 2007, como herramienta adicional.

El análisis estadístico de las variables discretas binarias se realizó mediante tablas de contingencia, gráficas de proporción, pruebas de Chi-cuadrado y análisis de correspondencias. En el caso de las variables cuantitativas, estas fueron estudiadas con gráficas de medias, análisis de la varianza (ADEVA) y la prueba de Tukey al 5% para aquellas variables que presentaron diferencia significativa.

CAPITULO 3: RESULTADOS

3.1. Etapa I: Establecimiento *in vitro*

Durante la etapa de establecimiento se evaluó tres protocolos de desinfección, los cuales recibieron un pre-tratamiento adicional a base de una solución de agua, detergente e hipoclorito de sodio, debido a una alta contaminación inicial observada. Para ello se obtuvo datos del número de explantes contaminados y de explantes vivos, a los quince y treinta días de incubación. Estas variables fueron analizadas mediante tablas de proporción y gráficos demostrativos.

3.1.1. Explantes contaminados

La contaminación en los explantes introducidos de cabuya presentó rangos de contaminación entre 0 a 20%. Estos valores varían según la especie y el protocolo empleado, donde *F. andina* presentó mayor porcentaje de contaminación, 10% a los 15 días y 20% a los 30 días, mediante la metodología descrita por Aureoles *et al.* (2008), como se observa en la Tabla 3.1. Por otro lado, la especie *A. americana* obtuvo 10% de contaminación a los 30 días de la evaluación mediante el protocolo modificado de Blanco *et al.* (2004). La contaminación de los explantes de cabuya blanca y cabuya azul ocurrió principalmente por la presencia de hongos en el material vegetal introducido.

Tabla 3.1. Porcentaje de contaminación de las cabuyas en el establecimiento.

Especie de cabuya			Contaminación (%)	
			15 días	30 días
Cabuya azul (<i>Agave americana</i>)	Tratamiento	Aureoles <i>et al.</i>	0,0	0,0
		Martínez <i>et al.</i>	0,0	0,0
		Blanco <i>et al.</i>	0,0	10,0
Cabuya blanca (<i>Furcraea andina</i>)	Tratamiento	Aureoles <i>et al.</i>	10,0	20,0
		Martínez <i>et al.</i>	0,0	0,0
		Blanco <i>et al.</i>	0,0	0,0

En la figura 3.1, se observa que en Cabuya azul (*Agave americana*), los protocolos descritos por Aureoles *et al.* (2008) y Martínez *et al.* (2006) obtuvieron 0% de contaminación siendo los mejores tratamientos de desinfección para esta especie. El tratamiento descrito por Blanco *et al.* (2004) mostró 10% de contaminación a los 30 días de incubación, sin embargo a los 15 días no presentó explantes contaminados.

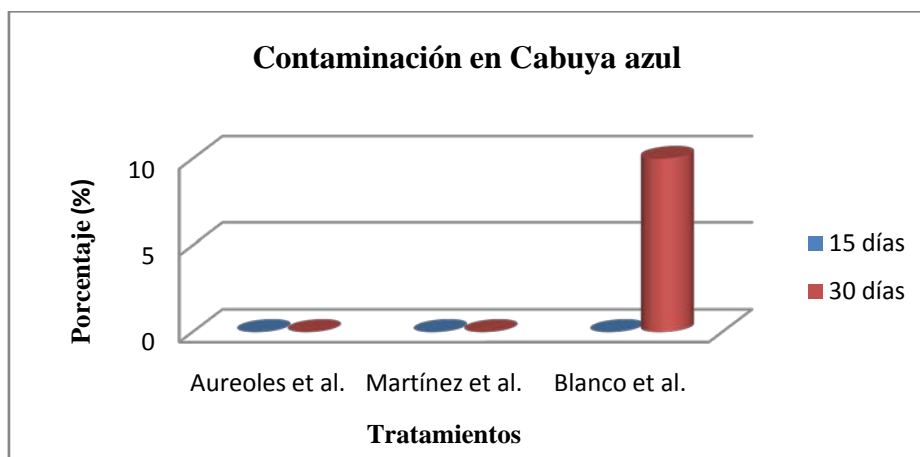


Figura 3.1. Porcentaje de contaminación en cabuya azul en la etapa de establecimiento.

En cabuya blanca (*Furcraea andina*), la menor contaminación (0%) se presentó en los métodos descritos por Martínez *et al.* (2006) y Blanco *et al.* (2004), a los 15 y 30 días de evaluación. El método de Aureoles *et al.* (2008) presentó un 10% de contaminación a los 15 días de incubación, valor que ascendió a 20% al final de la evaluación (figura 3.2).

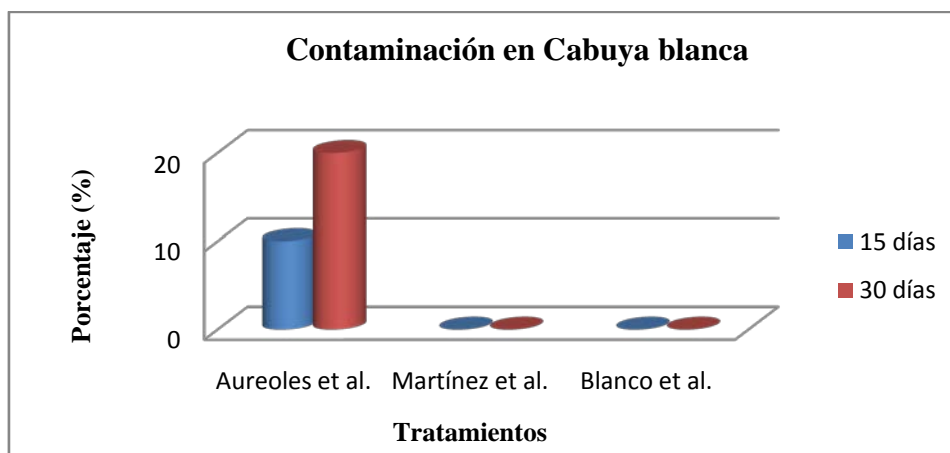


Figura 3.2. Porcentaje de contaminación de Cabuya blanca en la etapa de establecimiento.

3.1.2. Explantes vivos

En la tabla 3.2 se muestra el porcentaje de explantes vivos de cabuya azul y cabuya blanca a los 15 y 30 días de incubación.

Tabla 3.2. Porcentaje de explantes vivos de cabuya durante el establecimiento.

Especie de cabuya			Explantes vivos (%)	
			15 días	30 días
Cabuya azul (<i>Agave americana</i>)	Tratamiento	Aureoles <i>et al.</i>	100	100
		Blanco <i>et al.</i>	100	100
		Martínez <i>et al.</i>	100	100
Cabuya blanca (<i>Furcraea andina</i>)	Tratamiento	Aureoles <i>et al.</i>	100	100
		Blanco <i>et al.</i>	100	100
		Martínez <i>et al.</i>	100	100

En cabuya azul el porcentaje de explantes vivos fue de 100% en los tres tratamientos de desinfección, evaluados en un periodo de 15 y 30 días a partir de la siembra, figura 3.3.

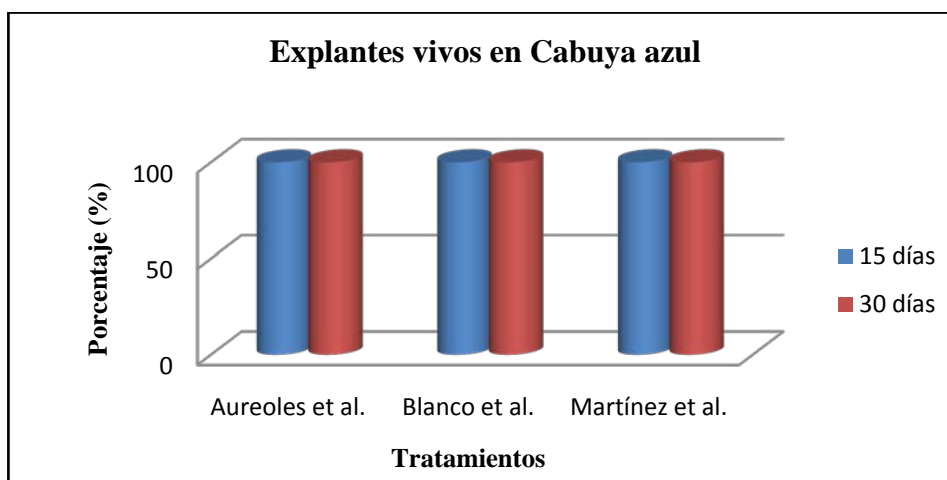


Figura 3.3. Porcentaje de explantes vivos de Cabuya azul en la etapa de establecimiento.

De igual manera, en cabuya blanca se observó 100% de explantes vivos durante los 15 y 30 días de incubación en los tres tratamientos evaluados, figura 3.4.

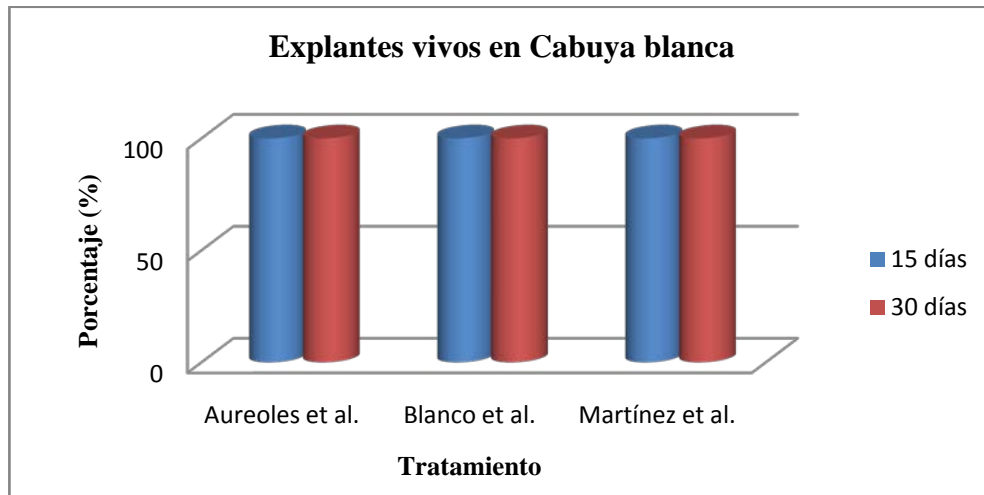


Figura 3.4. Porcentaje de explantes vivos de Cabuya azul en la etapa de establecimiento.

En la figura 3.5, se puede observar explantes de cabuya blanca que a pesar de estar contaminados con microorganismos (hongos), presentan sobrevivencia a los 30 días de incubación.



Figura 3.5. Explantes de cabuya blanca contaminados y vivos a los 30 días de incubación durante la etapa de establecimiento.

3.2. Etapa II: Multiplicación *in vitro*

En la etapa II, se determinó el mejor protocolo de multiplicación en cabuya blanca y cabuya azul, mediante la evaluación de cuatro variables: explantes regenerados, explantes con brotes, número de brotes por explante y tamaño promedio de los brotes (mm). Las variables discretas binarias fueron analizadas con tablas de frecuencia, conteo y datos de proporción, pruebas de Chi-cuadrado y análisis de correspondencia, mientras que las variables cuantitativas mediante comparaciones de medias, análisis de varianza (ADEVA) y la prueba de Tukey, cuando se presentó significancia estadística ($\alpha=0,05$).

En ambas especies los datos obtenidos del *número de brotes* fueron transformados para el análisis de la varianza, debido a que no se ajustaron a la normalidad ya que algunos explantes no presentaron brotes y se obtuvieron valores de cero. Para ello se empleó la ecuación $\sqrt{x + 1}$, donde x es el número de brotes. De la misma forma, los datos obtenidos de *tamaño promedio de brotes*, expresados en milímetros (mm), fueron transformados, para ello se empleó la ecuación $Ln x$.

En el ANEXO 8 se puede observar fotografías del desarrollo de brotes en los explantes de cabuya azul perteneciente a los tratamientos T2 y T4, durante la quinta semana de cultivo.

3.2.1. Cabuya azul (*Agave americana*)

3.2.1.1. Explantes regenerados

La regeneración de los explantes de cabuya azul en los medios de proliferación de brotes a la sexta semana de cultivo fue de 100% en todos los tratamientos de multiplicación, como se muestra en la tabla 3.3 y la figura 3.6.

Tabla 3.3. Porcentaje de explantes regenerados de cabuya azul.

Tratamiento	Citoquinina	Auxina	Explantes regenerados (%)
T1	1 mgL ⁻¹ BA	0,5 mgL ⁻¹ ANA	100
T2	3 mgL ⁻¹ BA	0,5 mgL ⁻¹ ANA	100
T3	1 mgL ⁻¹ BA	1,0 mgL ⁻¹ ANA	100
T4	3 mgL ⁻¹ BA	1,0 mgL ⁻¹ ANA	100
T5	1 mgL ⁻¹ KIN	0,5 mgL ⁻¹ ANA	100
T6	3 mgL ⁻¹ KIN	0,5 mgL ⁻¹ ANA	100
T7	1 mgL ⁻¹ KIN	1,0 mgL ⁻¹ ANA	100
T8	3 mgL ⁻¹ KIN	1,0 mgL ⁻¹ ANA	100
T9 – Control	0	0	100

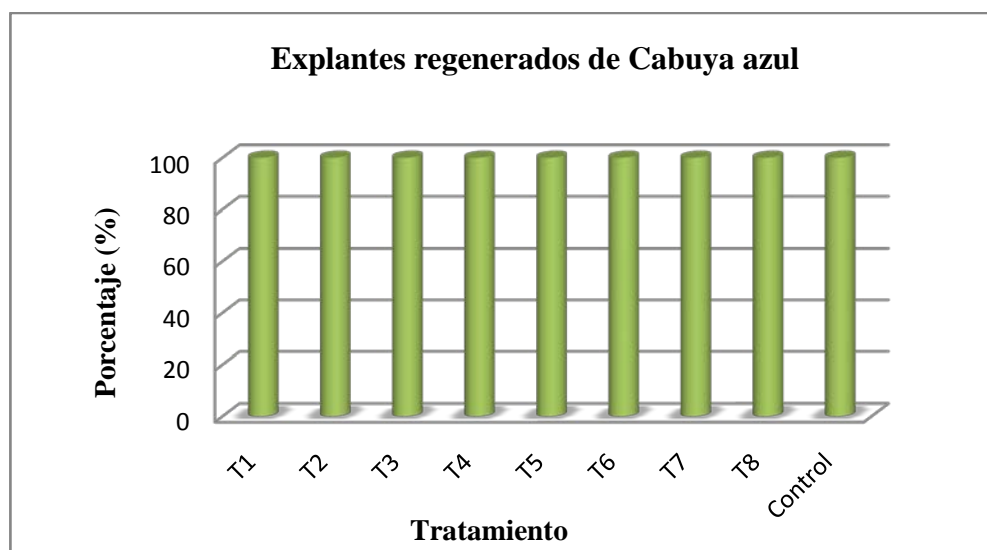


Figura 3.6. Porcentaje de explantes regenerados de cabuya azul.

3.2.1.2. Explantes con brotes

Los datos obtenidos de los explantes que presentaron brotes a la sexta semana de cultivo, se indican en el ANEXO 3. Los porcentajes más altos de explantes con brotes se obtuvieron en los tratamientos T1, T2 y T4 con valores de 100%, y en T6 con 80%, mientras que los tratamientos T5 y T8, presentaron 40% y 20% de brotación,

respectivamente; resultados que se muestran en la tabla 3.4 y la figura 3.7. Por otro lado, los tratamientos T3, T7 y T9 (control), no presentaron explantes con brotes.

Tabla 3.4. Proporción de explantes de cabuya azul con brotes.

Tratamiento	Citoquinina	Auxina	Explantes con brotes (%)
T1	1 mgL ⁻¹ BA	0,5 mgL ⁻¹ ANA	100
T2	3 mgL ⁻¹ BA	0,5 mgL ⁻¹ ANA	100
T3	1 mgL ⁻¹ BA	1,0 mgL ⁻¹ ANA	00
T4	3 mgL ⁻¹ BA	1,0 mgL ⁻¹ ANA	100
T5	1 mgL ⁻¹ KIN	0,5 mgL ⁻¹ ANA	40
T6	3 mgL ⁻¹ KIN	0,5 mgL ⁻¹ ANA	80
T7	1 mgL ⁻¹ KIN	1,0 mgL ⁻¹ ANA	00
T8	3 mgL ⁻¹ KIN	1,0 mgL ⁻¹ ANA	20
T9 – Control	0	0	00

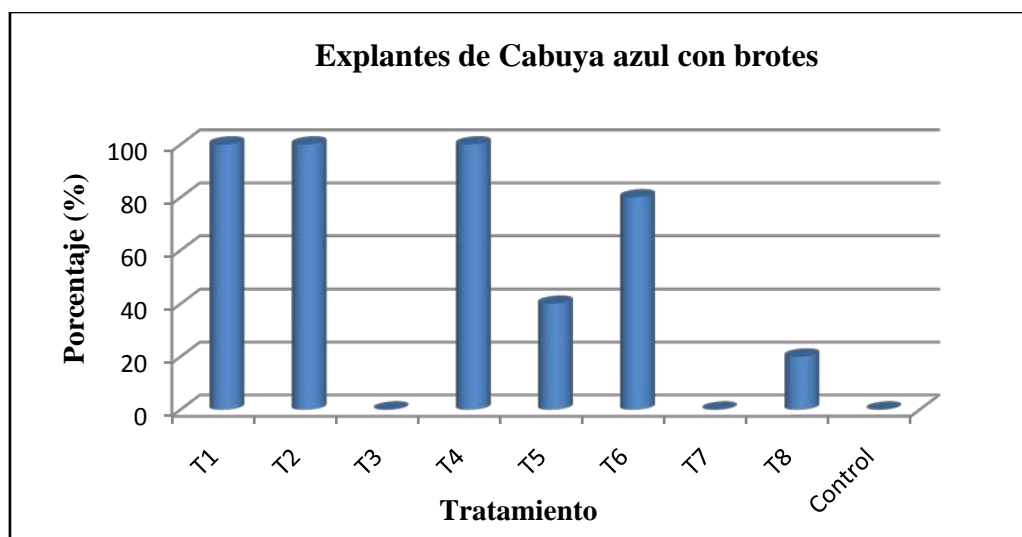


Figura 3.7. Porcentaje de explantes de cabuya azul con brotes.

Para determinar si existe dependencia entre los tratamientos de multiplicación y la presencia de brotes, se realizó una tabla de contingencia, que se puede observar en el ANEXO 9, y su respectiva prueba de Chi-cuadrado (Tabla 3.5).

La prueba Chi-cuadrado permitió determinar que a la sexta semana de cultivo el factor medio de multiplicación está asociado a la presencia de los brotes en los explantes de cabuya azul, con un valor de $p < 0,0001$.

Tabla 3.5. Prueba de Chi-cuadrado entre explantes con brotes de cabuya azul y tratamientos de multiplicación.

Hipótesis		Estadístico	
<i>Sexta semana</i>	Ha: El número de explantes con brotes de cabuya azul sí depende del medio de multiplicación a la sexta semana de cultivo.	Chi-cuadrado Pearson	Valor = 33,79 GL = 8 $p = < 0,0001$

Para observar la dependencia entre los tratamientos de multiplicación y la presencia de brotes en cabuya azul, se realizó el análisis de correspondencia⁴, los cálculos obtenidos se indican en el ANEXO 12. En la figura 3.8 se observa que los tratamientos T1, T2, T4 y T6 están relacionados con la presencia de brotes de los explantes (Si-brotes), en contraste con los tratamientos T7, T3, T9 y T8, donde hubo mayoritariamente ausencia de vástagos.

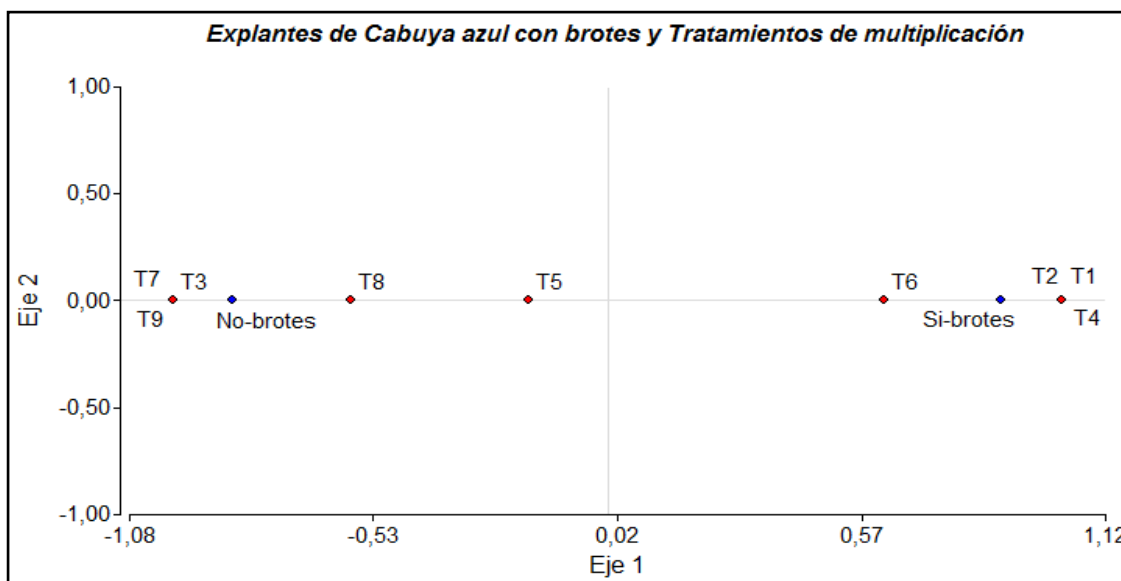


Figura 3.8. Grafica del análisis de correspondencias entre explantes de cabuya azul con brotes y los tratamientos de multiplicación en la etapa de multiplicación.

⁴ “Técnica estadística que se aplica al análisis de tablas de contingencia y construye un diagrama cartesiano entre las variables analizadas” (Salvador, 2003).

3.2.1.3. Número de brotes

Esta variable se obtuvo por conteo del número de brotes por cada explante cultivado a la sexta semana de cultivo en los nueve medios de multiplicación. Los datos obtenidos se indican en el ANEXO 3. En la tabla 3.6 y la figura 3.9 se muestra el número promedio de brotes por cada tratamiento de multiplicación. Estos valores se encuentran en un rango entre 0 a 11,4 brotes por explante, donde el tratamiento T4, compuesto de MBM suplementado con BAP (3 mgL^{-1}) y ANA (1 mgL^{-1}), presentó el mayor número promedio de brotes, con un valor de aproximadamente 11,4 brotes, seguido de los tratamientos T2 (6,0) y T1 (3,8). Los tratamientos T3, T7 y T9 (control) no presentaron brotes.

Tabla 3.6. Número de brotes por explante (\bar{x}) de cabuya azul.

Tratamiento	Citoquinina	Auxina	Brotos por explante (\bar{x})
T1	1 mgL^{-1} BA	$0,5 \text{ mgL}^{-1}$ ANA	3,8
T2	3 mgL^{-1} BA	$0,5 \text{ mgL}^{-1}$ ANA	6,0
T3	1 mgL^{-1} BA	$1,0 \text{ mgL}^{-1}$ ANA	0,0
T4	3 mgL^{-1} BA	$1,0 \text{ mgL}^{-1}$ ANA	11,4
T5	1 mgL^{-1} KIN	$0,5 \text{ mgL}^{-1}$ ANA	0,4
T6	3 mgL^{-1} KIN	$0,5 \text{ mgL}^{-1}$ ANA	2,4
T7	1 mgL^{-1} KIN	$1,0 \text{ mgL}^{-1}$ ANA	0,0
T8	3 mgL^{-1} KIN	$1,0 \text{ mgL}^{-1}$ ANA	0,8
T9 – Control	0	0	0,0

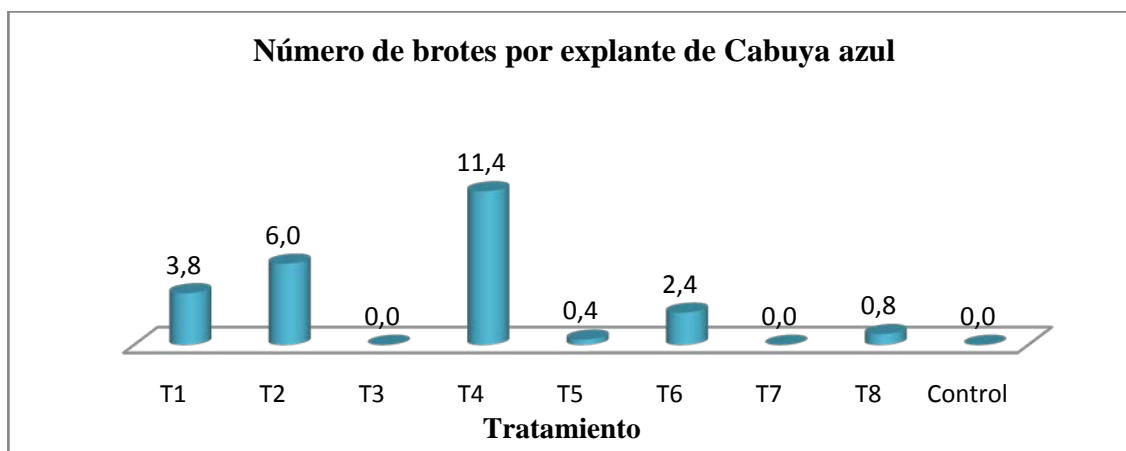


Figura 3.9. Número promedio de brotes por explante de cabuya azul.

El ADEVA realizado para evaluar el número de brotes (Tabla 3.7), mostró alta significativa ($p < 0,0001$) en el factor medio de multiplicación, es decir que por lo menos dos tratamientos son diferentes con respecto al número de brotes obtenidos. Los valores de la media cuadrática nos permiten corroborar el p-valor alcanzado ya que la variabilidad debido a los tratamientos es mayor que la del error en razón de 10,6 veces. Por consiguiente, se realizó la prueba Tukey para conocer los grupos homogéneos dentro de los tratamientos de multiplicación.

Tabla 3.7. ADEVA realizado para número de brotes en cabuya azul.

F.de V.	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	p-valor
Tratamiento	27,97	8	3,50	10,51	< 0,0001
Error	11,97	36	0,33		
Total	39,94	44			

CV=34%

La prueba de Tukey indica tres grupos estadísticamente homogéneos en los tratamientos de multiplicación, donde T4, T2 y T1 se encuentran en el grupo que presentó el mayor valor (A), es decir el número de brotes más alto a la sexta semana de cultivo constituyendo los mejores medios de multiplicación, Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Prueba de Tukey para número de brotes en cabuya azul.

Tratamiento	Medias	Grupos homogéneos		
T4	11,4	A		
T2	6,0	A	B	
T1	3,8	A	B	C
T6	2,4		B	C
T8	0,8			C
T5	0,4			C
T9	0,0			C
T7	0,0			C
T3	0,0			C

3.2.1.4. Tamaño promedio de brotes (mm)

Esta variable se obtuvo del promedio de las longitudes de los brotes de cada unidad experimental, a la sexta semana de cultivo en los nueve medios de multiplicación, datos que se indican en el ANEXO 3.

En la tabla 3.9 y figura 3.10, se indica el tamaño promedio por cada tratamiento, donde los brotes presentan longitudes en un rango de 6 mm a 32,8 mm. El tamaño mayor promedio de brotes se presentó en el tratamiento T1, con un valor de 32,8 mm seguido por el tratamiento T6 con 30,4 mm; mientras que la longitud de los tratamientos T2, T4 y T8 se encuentran en un rango de 22,0 mm a 26,6 mm. Además, el menor tamaño de brotes se observó en el tratamiento T5 (6 mm). Por otro lado, los tratamientos T3, T7 y T9, no indica valores promedios de longitud (SD), dado que no presentaron brotes.

Tabla 3.9. Longitud promedio de los brotes (mm) de cabuya azul.

Tratamiento	Citoquinina	Auxina	Tamaño \bar{x} de brotes (mm)
T1	1 mgL ⁻¹ BA	0,5 mgL ⁻¹ ANA	32,84
T2	3 mgL ⁻¹ BA	0,5 mgL ⁻¹ ANA	26,56
T3	1 mgL ⁻¹ BA	1,0 mgL ⁻¹ ANA	SD
T4	3 mgL ⁻¹ BA	1,0 mgL ⁻¹ ANA	22,04
T5	1 mgL ⁻¹ KIN	0,5 mgL ⁻¹ ANA	6,00
T6	3 mgL ⁻¹ KIN	0,5 mgL ⁻¹ ANA	30,35
T7	1 mgL ⁻¹ KIN	1,0 mgL ⁻¹ ANA	SD
T8	3 mgL ⁻¹ KIN	1,0 mgL ⁻¹ ANA	26,00
T9 – Control	0	0	SD

SD: Sin datos

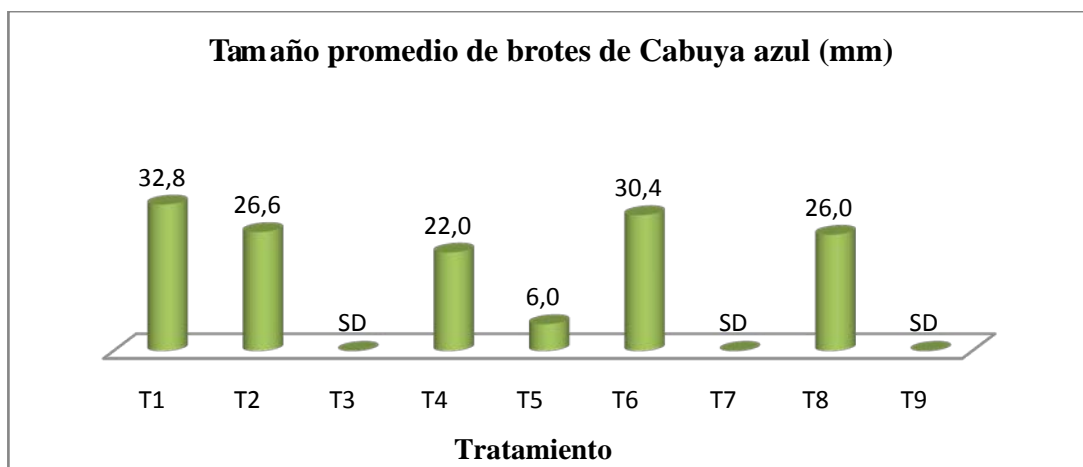


Figura 3.10. Tamaño promedio de brotes de cabuya azul (mm).

El ADEVA permitió concluir que los tamaños promedios de los brotes son estadísticamente iguales en los seis tratamientos de multiplicación en cabuya azul, ya que no se encontró diferencia significativa ($p=0,3003$) entre los tratamientos a las seis semanas de incubación, Tabla 3.10.

Tabla 3.10. ADEVA para longitud (mm) promedio de los brotes en cabuya azul.

F. de V.	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	p-valor
Tratamiento	3,71	5	0,74	1,33	0,3003
Error	8,90	16	0,56		
Total	12,60	21			

CV=24,79 %

3.2.2. Cabuya blanca (*Furcraea andina*)

3.2.2.1. Explantes regenerados

Durante la sexta semana de cultivo, los explantes de cabuya blanca presentaron 100% de regeneración en los nueve tratamientos de multiplicación, estos resultados se pueden observar en la tabla 3.11 y figura 3.11.

Tabla 3.11. Porcentaje de explantes regenerados de cabuya blanca.

Tratamiento	Citoquinina	Auxina	Explantes regenerados (%)
T1	1 mgL ⁻¹ BA	0,5 mgL ⁻¹ ANA	100
T2	3 mgL ⁻¹ BA	0,5 mgL ⁻¹ ANA	100
T3	1 mgL ⁻¹ BA	1,0 mgL ⁻¹ ANA	100
T4	3 mgL ⁻¹ BA	1,0 mgL ⁻¹ ANA	100
T5	1 mgL ⁻¹ KIN	0,5 mgL ⁻¹ ANA	100
T6	3 mgL ⁻¹ KIN	0,5 mgL ⁻¹ ANA	100
T7	1 mgL ⁻¹ KIN	1,0 mgL ⁻¹ ANA	100
T8	3 mgL ⁻¹ KIN	1,0 mgL ⁻¹ ANA	100
T9 – Control	0	0	100

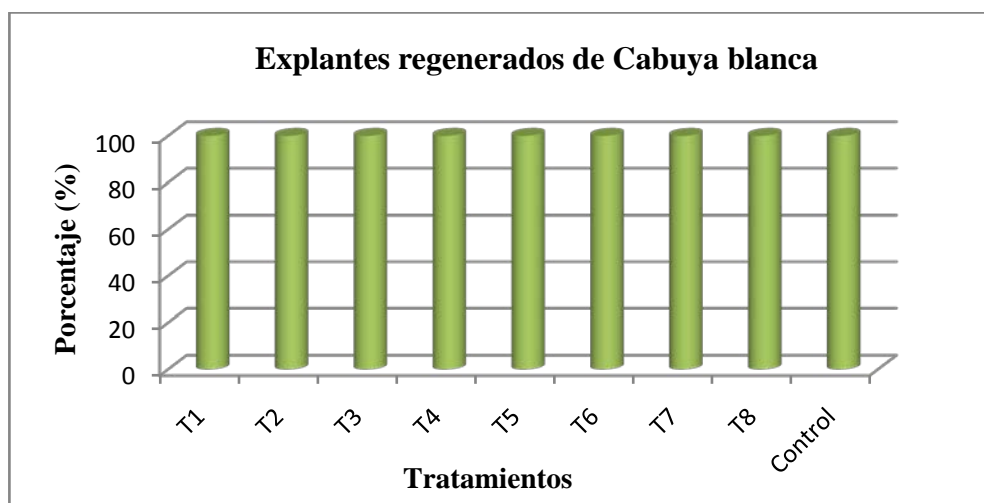


Figura 3.11. Porcentaje de explantes de cabuya blanca regenerados.

3.2.2.2. Explantes con brotes

Esta variable se obtuvo por conteo de los explantes que presentaron brotes en los nueve tratamientos de multiplicación en la sexta semana de cultivo; los datos obtenidos se indican en el ANEXO 4. Solamente los tratamientos T2 y T5, presentaron explantes con brotes, con porcentajes de 33,3% y 16,7%, respectivamente, como se observa en la tabla 3.12 y la figura 3.12.

Tabla 3.12. Porcentaje de explantes de cabuya blanca con brotes.

Tratamiento	Citoquinina	Auxina	Explantes con brotes (%)
T1	1 mgL ⁻¹ BA	0,5 mgL ⁻¹ ANA	0,0
T2	3 mgL ⁻¹ BA	0,5 mgL ⁻¹ ANA	33,3
T3	1 mgL ⁻¹ BA	1,0 mgL ⁻¹ ANA	0,0
T4	3 mgL ⁻¹ BA	1,0 mgL ⁻¹ ANA	0,0
T5	1 mgL ⁻¹ KIN	0,5 mgL ⁻¹ ANA	16,7
T6	3 mgL ⁻¹ KIN	0,5 mgL ⁻¹ ANA	0,0
T7	1 mgL ⁻¹ KIN	1,0 mgL ⁻¹ ANA	0,0
T8	3 mgL ⁻¹ KIN	1,0 mgL ⁻¹ ANA	0,0
T9 – Control	0	0	0,0

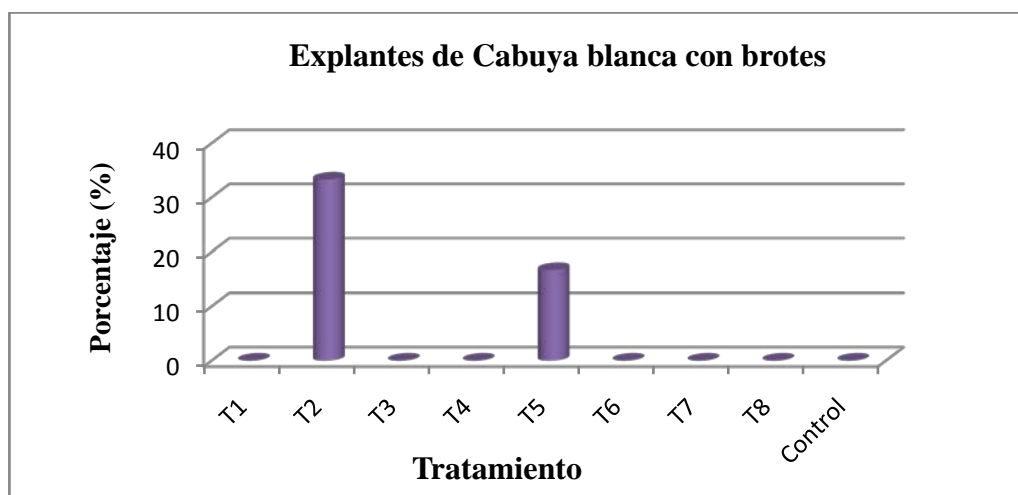


Figura 3.12. Porcentaje de explantes de cabuya blanca con brotes.

Para determinar asociación entre los tratamientos de multiplicación y la presencia de brotes, se realizó una tabla de contingencia (ANEXO 10) y la prueba de Chi-cuadrado.

Mediante la prueba Chi-cuadrado, se estableció que en la sexta semana de cultivo el número de explantes de cabuya blanca con brotes es independiente de los tratamientos de multiplicación analizados, al obtener un valor de $p=0,1224$; como se observa en la tabla 1.13.

Tabla 3.13. Prueba de Chi-cuadrado para la presencia de brotes en explantes de cabuya blanca y medios de multiplicación.

Hipótesis		Estadístico	
<i>Sexta semana</i>	Ha: El número de explantes de cabuya blanca con brotes es dependiente del medio de multiplicación a la sexta semana de cultivo.	Chi-cuadrado Pearson	Valor = 12,71 GL = 8 p = 0,1224

3.2.2.3. Número de brotes

El número de brotes se obtuvo por conteo de los vástagos de cada explante cultivado a la sexta semana de cultivo en los nueve tratamientos de multiplicación; los valores obtenidos se indican en el ANEXO 4.

En la tabla 3.14 se calculó el número de brotes promedio por cada tratamiento en la sexta semana de cultivo; donde solo los tratamientos T2 y T5 presentaron brotes, con un valor de media de 0,33 y 0,17, respectivamente. En el ANEXO 8 se puede observar fotografías del crecimiento de brotes en explantes de cabuya blanca pertenecientes al tratamiento T2.

Tabla 3.14. Medias del número de brotes por explante de cabuya blanca.

Tratamiento	Citoquinina	Auxina	Brotes por explante (\bar{x})
T1	1 mgL ⁻¹ BA	0,5 mgL ⁻¹ ANA	0
T2	3 mgL ⁻¹ BA	0,5 mgL ⁻¹ ANA	0,33
T3	1 mgL ⁻¹ BA	1,0 mgL ⁻¹ ANA	0
T4	3 mgL ⁻¹ BA	1,0 mgL ⁻¹ ANA	0
T5	1 mgL ⁻¹ KIN	0,5 mgL ⁻¹ ANA	0,17
T6	3 mgL ⁻¹ KIN	0,5 mgL ⁻¹ ANA	0
T7	1 mgL ⁻¹ KIN	1,0 mgL ⁻¹ ANA	0
T8	3 mgL ⁻¹ KIN	1,0 mgL ⁻¹ ANA	0
T9 – Control	0	0	0

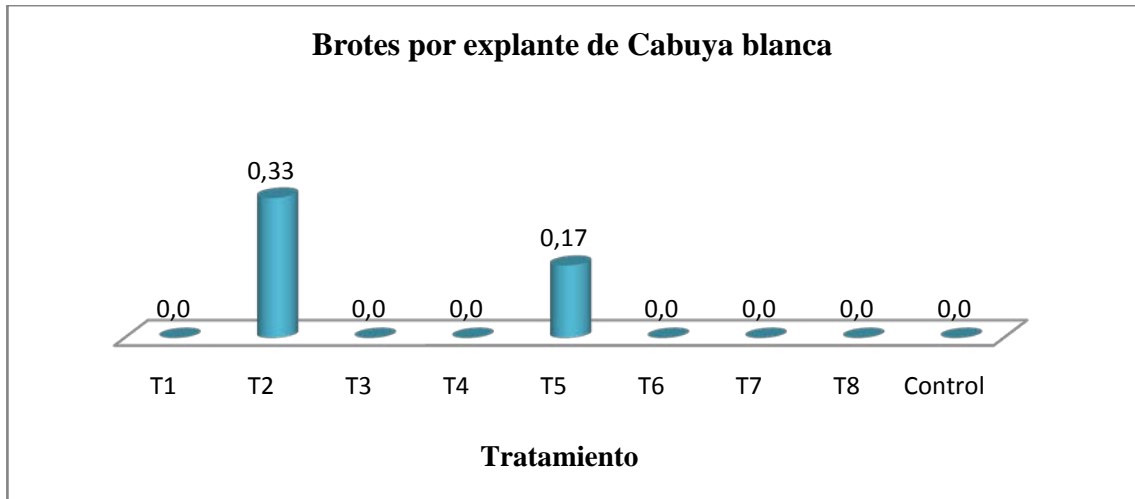


Figura 3.13. Número promedio de brotes por explantes de cabuya blanca.

La comparación entre los nueve tratamientos de multiplicación en función al número de de brotes por explante de cabuya blanca, se llevo a cavo mediante el análisis de la varianza con los datos obtenidos que se indican en el ANEXO 4. El ADEVA mostró que el número de brotes por explante es estadísticamente igual en los nueve tratamientos de multiplicación ($p=0,1173$), durante la sexta semana de cultivo (Tabla 3.15).

Tabla 3.15. ADEVA para número de brotes por explante de cabuya blanca.

F. de V.	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	p-valor
Tratamientos	0,11	8	0,01	1,73	0,1173
Error	0,36	45	0,01		
Total	0,48	53			

CV= 8,8%

3.4.2.4. Tamaño promedio de brotes (mm)

La variable tamaño promedio de brotes no fue tomada y analizada ya que no hubo suficientes datos para la comparación de medias y análisis de la varianza.

3.3.Etapa III: Enraizamiento *in vitro*

En la etapa de enraizamiento *in vitro*, se evaluó la presencia de raíz, el número de raíces y el tamaño de la raíz expresada en milímetros a los quince y treinta días posteriores a la siembra, en plántulas de cabuya azul y cabuya blanca. Para el análisis estadístico de la variable presencia de raíz se realizó tablas de contingencia, gráficos demostrativos y pruebas de Chi-cuadrado. Para el análisis de las variables numéricas se efectuó comparaciones de medias con gráficos demostrativos, análisis de la varianza (ADEVA) y la prueba de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para el análisis de la varianza, la variable *número de raíces* fue transformada al no ajustarse a la normalidad ya que ciertos brotes no presentaron raíz a los quince y treinta días de cultivo, se utilizó la fórmula $\sqrt{x + 1}$. De igual manera se realizó para *tamaño de raíz* expresada en milímetros, variable que fue transformada mediante $\ln x$.

En el ANEXO 8 se puede observar fotografías de brotes enraizados de cabuya azul y cabuya blanca a los treinta días de incubación.

3.3.1. Cabuya azul (*Agave americana* L.)

3.3.1.1.Presencia de raíz

Esta variable se determinó mediante el conteo de las plántulas que presentaron raíz en cada tratamiento de enraizamiento a los 15 y 30 días de incubación, los datos obtenidos se muestran en el ANEXO 5.

En la tabla 3.16 y la figura 3.14 se presenta el porcentaje de enraizamiento en cabuya azul. A los quince días de cultivo, los brotes mostraron del 50% al 60% de enraizamiento, donde el tratamiento E2 presentó el porcentaje más alto. La presencia de raíz en los brotes mostró un incremento a valores entre 80,0% y 90,91%, a los treinta días

de cultivo, donde el medio E1 ó control (sin reguladores de crecimiento) presentó 90,91% de enraizamiento, a diferencia de los tratamientos E2 y E3 los cuales contenían AIA (11,42uM) e IBA (0,5ppm), respectivamente.

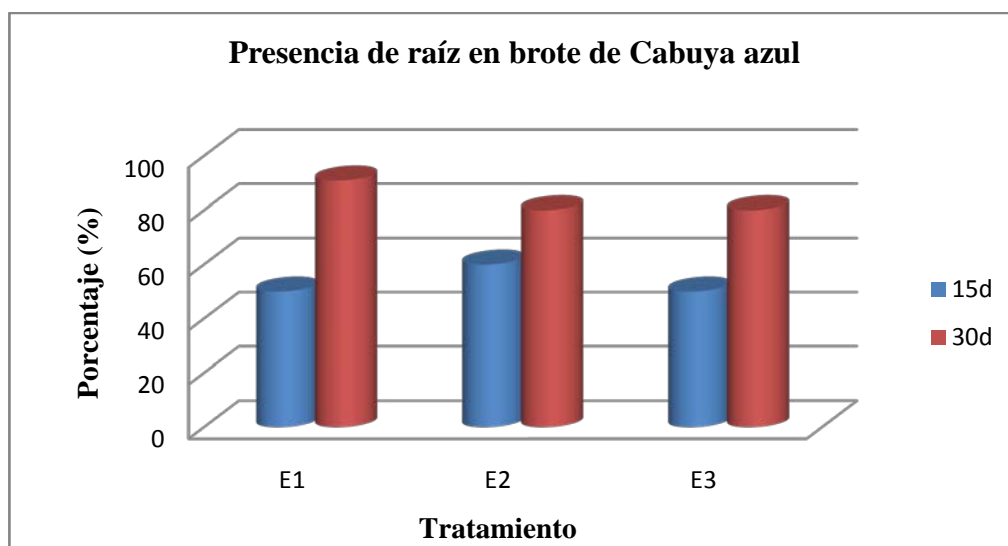


Figura 3.14. Presencia de raíz en brotes de cabuya azul.

Tabla 3.16. Porcentaje de enraizamiento en brotes de cabuya azul.

Tratamiento	Auxina	Brotos Enraizados (%)	
		15 días	30 días
E1	0	50,0	90,91
E2	11,42uM de AIA	60,0	80,0
E3	2,46uM de IBA	50,0	80,0

Para determinar dependencia entre la presencia de raíz y los tratamientos de enraizamiento se realizó tablas de contingencia, que se indican en el ANEXO 11, y la prueba de Chi-cuadrado.

La prueba de Chi-cuadrado, tabla 3.17, encontró que la presencia de la raíz en los brotes de cabuya azul no mostró dependencia a los tratamientos de enraizamiento durante los quince ($p=0,8747$) y treinta días de incubación ($p=0,7319$).

Tabla 3.17. Prueba Chi-cuadrado entre presencia de raíz y tratamientos de enraizamiento en cabuya azul.

Hipótesis		Estadístico	
<i>Quince días</i>	Ha: La presencia de raíz en brotes de cabuya azul sí depende del medio de enraizamiento a los 15 días de cultivo.	Chi-cuadrado Pearson	Valor = 0,27 GL = 2 p = 0,8747
<i>Treinta días</i>	Ha: La presencia de raíz en brotes de cabuya azul sí depende del medio de enraizamiento a los 30 días de cultivo.	Chi-cuadrado Pearson	Valor = 0,62 GL = 2 p = 0,7319

3.3.1.2. Número de raíces

Para evaluar los tratamientos de enraizamiento, se contó el número de raíces producidas por cada brote de cabuya azul cultivado, a los quince y treinta días a partir de la siembra (ANEXO 5). Mediante el análisis de las medias de los datos experimentales obtenidos, se encontró que el tratamiento E2 a los quince y treinta días de cultivo presentó el mayor número de raíces, tabla 3.18 y figura 3.15.

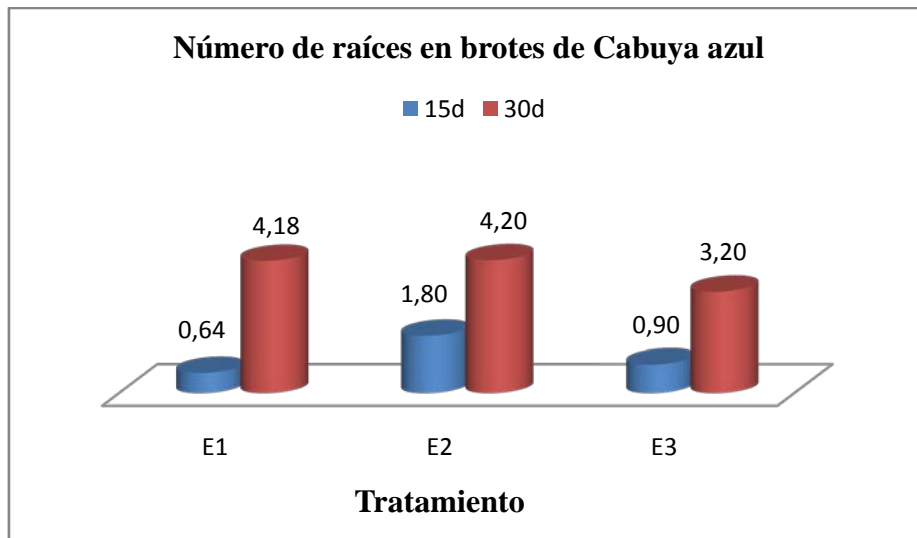


Figura 3.15. Número de raíces promedio por brote de cabuya azul.

Tabla 3.18. Media del número de raíces por tratamiento de enraizamiento en cabuya azul.

Tratamiento	Auxina	Número de raíces (\bar{x})	
		15 días	30 días
E1- Control	0	0,64	4,18
E2	11,42uM de AIA	1,80	4,20
E3	2,46uM de IBA	0,90	3,20

En la Tabla 3.19 se observa el análisis de la varianza entre los tres tratamientos de enraizamiento y el número de raíces a los quince días de cultivo. El resultado muestra que el promedio del número de raíces es estadísticamente igual en los tres tratamientos evaluados, con un valor de probabilidad de $p = 0,2551$.

De igual manera, el ADEVA (Tabla 3.20) realizado para el número de raíces a los treinta días de evaluación, mostró que no hubo diferencia significativa ($p=0,7189$) para el número de raíces en los tres tratamientos evaluados.

Tabla 3.19. ADEVA para Número de raíces de cabuya azul a los 15 días de cultivo.

F. de V.	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	p-valor
Tratamiento	0,61	2	0,30	1,44	0,2551
Error	5,93	28	0,21		
Total	6,53	30			

CV=33,5%

Tabla 3.20. ADEVA para Número de raíces de cabuya azul a los 30 días de cultivo.

F. de V.	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	p-valor
Tratamiento	0,31	2	0,15	0,33	0,7189
Error	12,94	28	0,46		
Total	13,25	30			

CV= 32,25%

3.3.1.3. Tamaño de raíz (mm)

Los resultados de las longitudes de la raíz por cada brote de cabuya analizado se puede observar en el ANEXO 5. Los tamaños promedios de las raíces por tratamiento se presentan en la tabla 3.21. En esta tabla se puede observar que a los quince días de cultivo el tratamiento E2 obtuvo una longitud de 18,00 mm de raíz, valor superior a los tratamientos E1 (control) y E3, sin embargo la respuesta de este tratamiento cambia de sentido a los treinta días, al obtener la mayor longitud en explantes, los tratamientos E1 y E3, con 54,80 mm y 54,63 mm, respectivamente, valores que superan al valor obtenido por el tratamiento E2 (Tabla 3.21 y figura 3.16).

Tabla 3.21. Medias del tamaño de raíz (mm) en cabuya azul.

Tratamiento	Auxina	Tamaño de raíz (mm)	
		15 días	30 días
E1 - Control	0	6,80	54,8
E2	11,42uM de AIA	18,00	45,25
E3	2,46uM de IBA	15,40	54,63

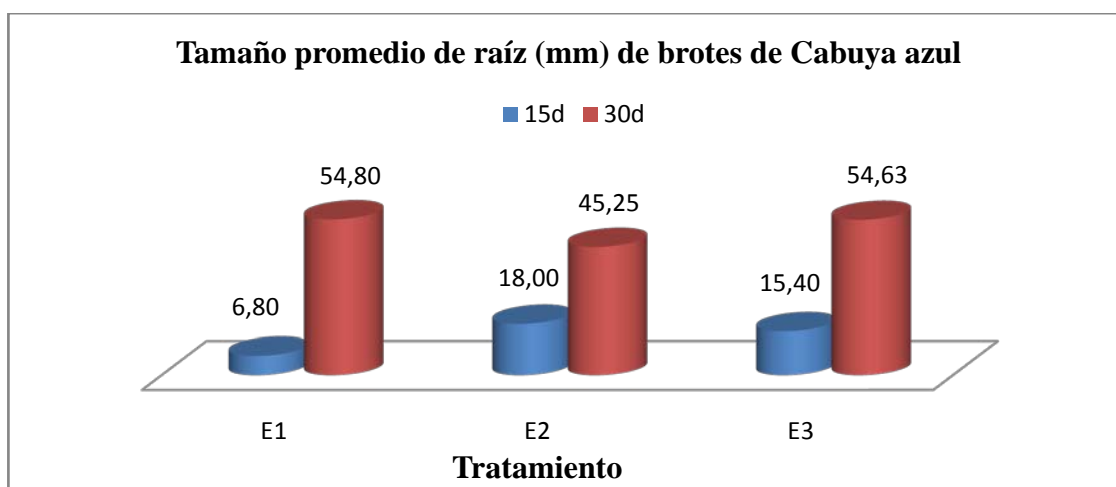


Figura 3.16. Tamaño promedio de raíz de brotes de cabuya azul (mm).

El análisis de la varianza se realizó con los datos del ANEXO 5; donde se encontró que a los 15 días de cultivo no hubo diferencia significativa ($p=0,1607$) en el factor medio de enraizamiento, es decir que la media del tamaño de la raíz fue igual estadísticamente, en al menos dos de los tratamientos (Tabla 3.22).

Tabla 3.22. ADEVA para tamaño de la raíz (mm) en cabuya azul a los 15 días de cultivo.

F. de V.	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	p-valor
Tratamiento	2,44	2	1,22	2,11	0,1607
Error	7,50	13	0,58		
Total	9,94	15			

CV=32,38%

De igual manera, durante los treinta días de cultivo el análisis de la varianza no mostró diferencia significativa ($p=0,6252$) en el factor medio de enraizamiento, es decir que se comportaron estadísticamente de manera similar con respecto a la longitud de la raíz, Tabla 3.23.

Tabla 3.23. ADEVA para tamaño de raíz (mm) en cabuya azul a los 30 días de cultivo.

F. de V.	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	p-valor
Tratamiento	0,18	2	0,09	0,48	0,6252
Error	4,22	23	0,18		
Total	4,39	25			

CV= 11,07 %

3.3.2. Cabuya blanca (*Furcraea andina* Trel.)

3.3.2.1. Presencia de raíz

La presencia de raíz en brotes de cabuya blanca se determinó mediante el conteo de las plántulas que desarrollaron raíz en cada tratamiento de enraizamiento, durante los 15 y 30 días de cultivo, los datos obtenidos se indican en el ANEXO 6.

La presencia de raíz en plántulas de cabuya blanca fue muy homogénea en los tres tratamientos, así se puede observar que a los quince días de cultivo hay 80% de enraizamiento, ascendiendo a 100% a los treinta días de siembra en todos los tratamientos, Tabla 3.24 y Figura 3.17. Esto sugiere que la inducción al desarrollo de raíces en cabuya blanca puede ser obtenido en un 100% a los treinta días de incubación, en presencia o ausencia de auxinas.

Tabla 3.24. Porcentaje de enraizamiento en brotes de cabuya blanca.

Tratamiento	Auxina	Brotes Enraizados (%)	
		15 días	30 días
E1	0	80	100
E2	11,42 uM de AIA	80	100
E3	2,46 uM de IBA	80	100

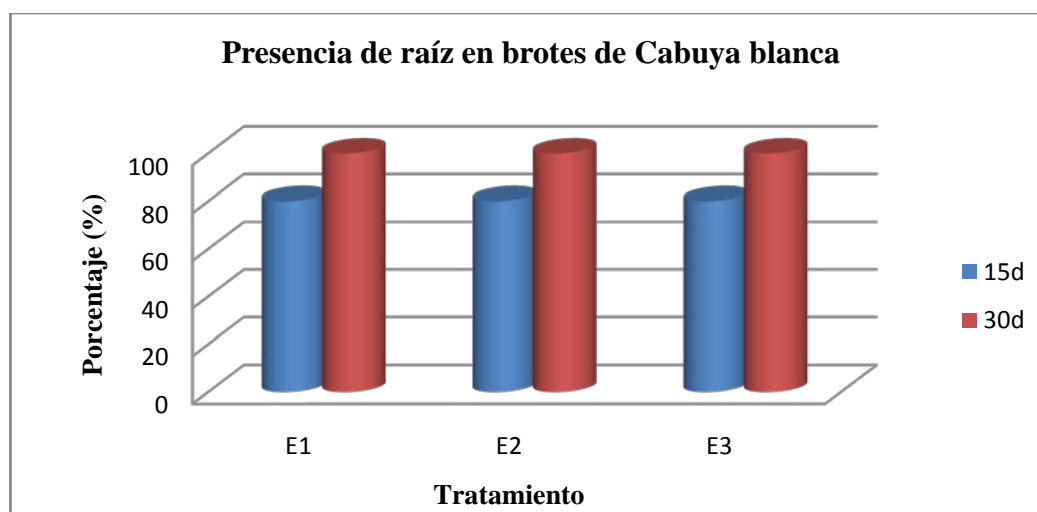


Figura 3.17. Presencia de raíz en brotes de cabuya blanca.

3.3.2.3. Número de raíces

La eficiencia del medio de enraizamiento para cabuya blanca se determinó mediante el conteo del número de raíces producidas por cada explante a los quince y treinta días a

partir de la siembra (ANEXO 6). Mediante la comparación de las medias de los datos experimentales, se encontró que el tratamiento E3 a los quince y treinta días presentó el mayor número de raíces, siendo aproximadamente 2(2,3) y 3(3,2) raíces, respectivamente, tabla 3.25 y figura 3.18.

Tabla 3.25. Media del número de raíces por tratamiento de enraizamiento en cabuya blanca.

Tratamiento	Auxina	Número de raíces (\bar{x})	
		15 días	30 días
E1	0	1,00	1,70
E2	11,42uM de AIA	1,50	2,30
E3	2,46uM de IBA	2,30	3,20

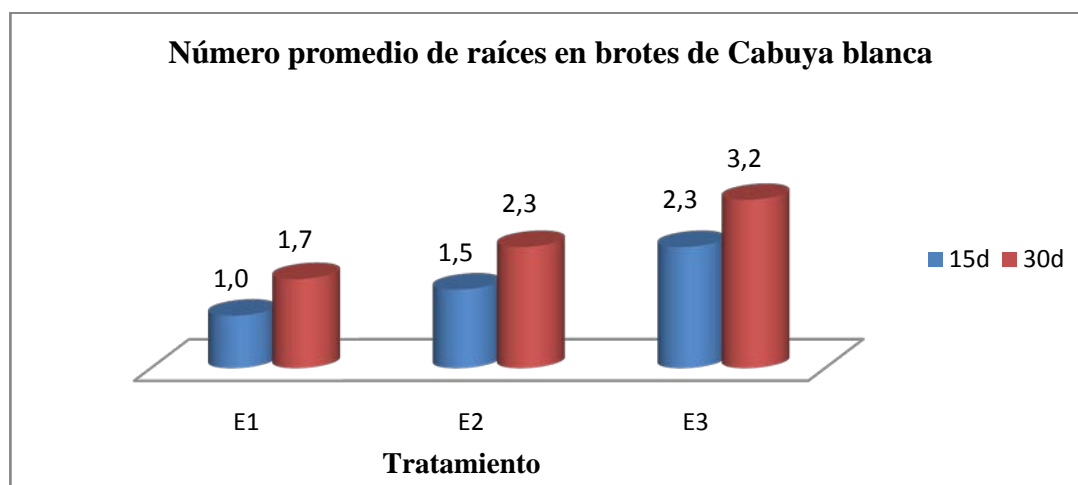


Figura 3.18. Número de raíces promedio en brotes de cabuya blanca.

Los resultados del ADEVA, a los quince días de siembra, indicaron que no hubo diferencia significativa en el factor medio de enraizamiento ($p=0,1548$), cuando se analizó el número de raíces en cabuya blanca, Tabla 3.26.

Tabla 3.26. ADEVA para número de raíces en cabuya blanca en los 15 días de cultivo.

F. deV.	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	p-valor
Tratamientos	0,67	2	0,33	2,00	0,1548
Error	4,49	27	0,17		
Total	5,16	29			

CV= 26%

A los treinta días de cultivo, las medias del número de raíces en cabuya blanca en los tres tratamientos fueron estadísticamente iguales, ya que el ADEVA mostró diferencia no significativa ($p=0,1351$) en el factor medio de enraizamiento (Tabla 3.27).

Tabla 3.27. ADEVA para número de raíces en cabuya blanca a los 30 días de cultivo.

F. deV.	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	p-valor
Tratamientos	0,87	2	0,43	2,16	0,1351
Error	5,43	27	0,20		
Total	6,30	29			

CV=30%

3.3.2.4. Tamaño de raíz

Los resultados de las longitudes de la raíz de cada brote de cabuya blanca analizado se puede observar en el ANEXO 6. La comparación de las medias en los explantes de cabuya blanca mostraron que a los quince días de cultivo, el tratamiento E1 (control) y E3 presentaron la mayor longitud de raíz, 14 mm y 13,6 mm, respectivamente. Comportamiento que se mantiene a los treinta días de cultivo, donde las longitudes mayores son 37,9 mm y 37,4mm, observadas en el tratamiento E3 y E1; tabla 3.28 y figura 3.19.

Tabla 3.28. Medias del tamaño de raíz de brotes de cabuya blanca.

Tratamiento	Auxina	Tamaño \bar{x} de raíz (mm)	
		15 días	30 días
E1	0	14,00	37,40
E2	11,42 uM de AIA	9,63	28,15
E3	2,46 uM de IBA	13,63	37,90

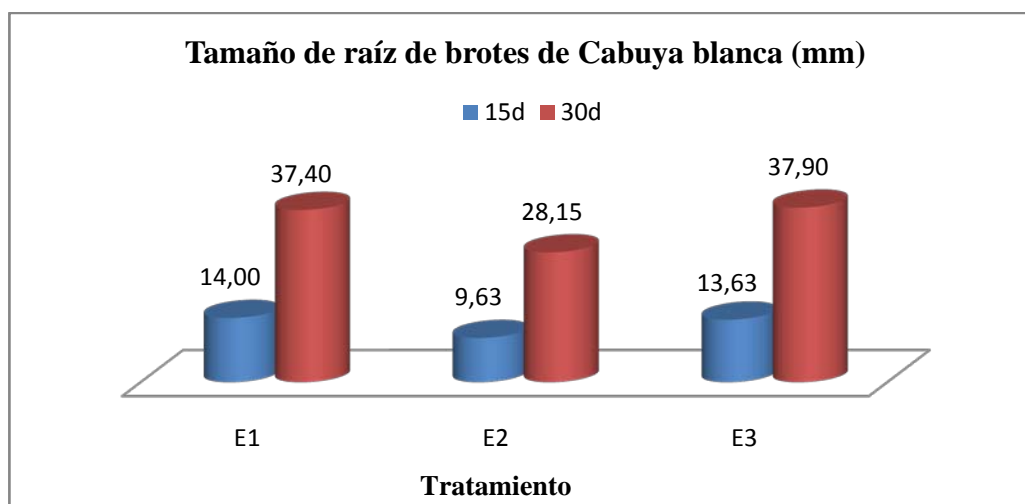


Figura 3.19. Tamaño promedio de raíz de brotes de cabuya blanca (mm).

El análisis de la varianza permitió comparar las longitudes de la raíz en los tres medios de enraizamiento, donde se determinó que no hubo diferencia significativa entre ellos, a los quince ($p=0,2504$) y treinta días de cultivo ($p=0,5161$), es decir que medios de cultivo analizados se comportaron de manera estadísticamente similar para inducir el crecimiento de raíz en los brotes, Tabla 3.29 y Tabla 3.30.

Tabla 3.29. ADEVA para tamaño de raíz (mm) en cabuya blanca a los 15 días de cultivo.

F. de V.	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	p-valor
Tratamiento	0,80	2	0,40	1,48	0,2504
Error	5,65	21	0,27		
Total	6,45	23			

CV=21,72%

Tabla 3.30. ADEVA para tamaño de raíz (mm) en cabuya blanca a los 30 días de cultivo.

F. de V.	Suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	p-valor
Tratamiento	0,72	2	0,36	0,68	0,5161
Error	14,26	27	0,53		
Total	14,98	29			

CV=21,65%

3.4. Análisis económico

Se aplicó la metodología de costeo por procesos para producción de plantas *in vitro* de cabuya azul y cabuya blanca, con la información que se obtuvo en las etapas de desinfección, multiplicación y enraizamiento, a escala piloto.

3.4.1. Cabuya azul

La estimación de los costos de producción se realizó para 40000 plantas de cabuya azul, producción de un año de proceso, a escala de planta piloto. Para lo cual se tomaron en cuenta los costos directos de insumos, maquinaria y equipos, utensilios, materiales de producción y mano de obra directa.

Los tratamientos seleccionados para la estimación de los costos de producción fueron: 1) el pre-tratamiento (agua-detergente-hipoclorito de sodio) y el tratamiento descrito por Aureoles *et al.* para la desinfección de los explantes, 2) el T4 durante la etapa de multiplicación y 3) el E1 (medio basal sin reguladores) para el enraizamiento de los explantes.

El costo para el rubro de insumos directos fue de 3550,13 dólares, como se muestra en la tabla 3.31.

Tabla 3.31. Determinación del costo de insumos directos para cabuya azul.

Descripción	Unidad	Cantidad	Valor/unidad (USD)	Valor total (USD)
Medio M&S Phyto-technology	L	666,56	1,700	1133,155
Ácido Indol acético (AIA)	g	0,001	25,800	0,014
Ácido naftalenacético	mg	144,59	0,400	57,835
Agar	g	4665,93	0,280	1306,461
Agua destilada	L	730,62	0,300	219,187
Benciladenina (BA)	mg	449,96	0,030	13,499
Sulfato de Adenina	g	53,32	4,520	241,029
Tiamina	g	0,27	2,480	0,661
Mio-inositol	g	66,66	0,750	49,992
Azúcar	kg	20,00	0,800	15,997
Agua de Coco	L	33,33	2,140	71,322
Alcohol Potable 96%	L	55,34	2,110	116,762
Hipoclorito de Sodio (5,25%)	L	30,44	1,250	38,050
Tween 20	ml	30,00	0,100	3,000
Ácido ascórbico	g	3,00	0,880	2,640
Ácido cítrico	g	4,50	0,220	0,990
Detergente	g	60,00	0,003	0,150
Mandil	Unidad	1,00	8,00	8,00
Marcadores	Unidad	2,00	2,00	4,00
Tijeras	Unidad	1,00	2,00	2,00
Cinta autoclavable	Rollo	3,00	10,00	30,00
Fundas	Unidad	250,00	0,01	2,50
Guantes	Par	55,00	0,65	35,75
Hoja Bisturí	Unidad	190,00	0,20	38,00
Jabón Líquido	L	4,00	2,50	10,00
Papel Absorbente	Paquete	15,00	1,90	28,50
Papel Aluminio	Paquete	11,00	4,00	44,00
Servilletas	Paquete	4,00	1,06	4,24
Zapatos	Unidad	1,00	30,00	30,00
Rolopac	Paquete	10,00	3,20	32,00
Mascarilla	Unidad	52,00	0,20	10,40
TOTAL				3550,13

Los costos de depreciación para los materiales del laboratorio, se detallan en la tabla 3.32. El costo por año se determinó a partir de la relación entre el costo de los materiales y su vida útil en años. El costo del uso de los materiales se estableció a partir del costo año, para la producción de plantas de cabuya azul *in vitro*, en un año. Se obtuvo para este rubro un valor de 1109,30 dólares.

Tabla 3.32. Determinación del costo de depreciación para los materiales de laboratorio para cabuya azul.

Materiales	Unidad	Costo Unitario (USD)	Cantidad	Costo Total (USD)	Vida útil (años)	Costo Uso (USD)
Barras Magnéticas	Unidad	3,00	2	6,00	3	2,00
Espátula	Unidad	4,00	1	4,00	2	2,00
Mangos de Bisturí	Unidad	15,00	2	30,00	3	10,00
Mecheros de Alcohol	Unidad	4,00	1	4,00	2	2,00
Pinzas	Unidad	20,00	2	40,00	3	13,33
Pipeta 10 ml	Unidad	2,00	1	2,00	2	1,00
Pipeta 1ml	Unidad	1,89	1	1,89	2	0,95
Probeta Graduada 500ml	Unidad	16,40	1	16,40	2	8,20
Probeta Graduada 25ml	Unidad	6,30	1	6,30	2	3,15
Frascos de vidrio	Unidad	0,40	8000	3200,00	3	1066,67
TOTAL						1109,30

El costo directo de maquinaria y equipos se determinó a partir de la relación entre el costo de este, su vida útil y el porcentaje de utilidad, para los 365 días al año. El costo del uso de las maquinarias y equipos se estableció a partir del costo día, por los días utilizados, para la producción de plantas de cabuya azul *in vitro*, en un año. Se obtuvo para este rubro un valor de 815,83 dólares. Los costos de depreciación para maquinarias y equipos se detallan en la tabla 3.33.

El detalle de los costos de los suministros para la producción de plantas *in vitro* a escala piloto, se puede observar en la tabla 3.34, donde se estimó el consumo anual de acuerdo a los equipos que existen en el laboratorio y su tiempo de utilización. El valor para este rubro es de 1058,52 dólares.

Tabla 3.33. Determinación del costo de depreciación para maquinarias y equipos para cabuya azul.

Equipo	Unidad	Costo (USD)	Vida útil (años)	Porcentaje de utilidad	Costo día (USD)	Días utilizados	Costo uso (USD)
Agitador magnético	Unidad	432	7	100%	0,17	123,00	20,80
Autoclave	Unidad	900	5	100%	0,49	160,05	78,93
Balanza de precisión	Unidad	2500	7	100%	0,98	126,60	123,88
Cámara de flujo laminar	Unidad	12500	10	50%	1,71	197,75	338,61
Dispensador de medio	Unidad	100	5	100%	0,05	126,60	6,94
Estufa	Unidad	1500	10	100%	0,41	9,00	3,70
Microondas	Unidad	170	7	100%	0,07	126,60	8,42
pH-metro	Unidad	760	5	100%	0,42	126,60	52,72
Refrigeradora	Unidad	600	10	50%	0,08	118,60	9,75
Cámara de crecimiento	Unidad	3750	10	50%	0,51	335,00	172,09
TOTAL							815,83

Tabla 3.34. Determinación del costo de suministros de producción para cabuya azul.

Suministro	Unidad	Consumo anual	Valor unidad (USD)	Valor Total (USD)
Luz	kWh	9487,51	0,08	759,00
Agua	m ³	768,00	0,39	299,52
TOTAL				1058,52

El costo de mano de obra directa se presenta en la tabla 3.35. Se requiere de un operario a tiempo completo. El costo total es de 3886,2 dólares para este rubro.

Tabla 3.35. Determinación del costo de mano de obra directa para cabuya azul.

Personal	Unidad	Sueldo mensual (USD)	Cantidad	Valor total (USD)
Operario	Mes	323,85	12	3886,2
TOTAL				3886,2

El costo total de producción para obtener 40000 plantas de cabuya azul en un periodo de un año, para el presente estudio es de 10940,98 dólares, como se observa en lo determinado en la tabla 3.36.

Tabla 3.36. Determinación del costo de producción para cabuya azul.

COSTO DE PRODUCCIÓN	(USD)
Insumos directos	3550,13
Maquinaria y equipos	815,83
Materiales de laboratorio	1109,30
Suministros	1058,52
Personal	3886,20
Suman	10419,98
Valor total del costo de producción	10419,98
Imprevistos (5%)	521,00
COSTO TOTAL DE PRODUCCIÓN	10940,98

El costo unitario de una planta *in vitro* de cabuya azul enraizada se calculó a escala piloto determinado en 0,27 dólares, para un rendimiento anual de 40000 plantas.

3.4.2. Cabuya blanca

La estimación de los costos de producción se realizó para 13000 plantas de cabuya blanca, producción de un año de proceso, a escala de planta piloto. Para lo cual se tomaron en cuenta los costos directos de insumos, maquinaria y equipos, utensilios, materiales de producción y mano de obra directa.

Los tratamientos seleccionados para la estimación de los costos de producción fueron: 1) el pre-tratamiento (agua-detergente-hipoclorito de sodio) y el tratamiento descrito por Martínez *et al.* para la desinfección de los explantes, 2) el T2 durante la etapa de multiplicación y 3) el E1 (medio basal sin reguladores) para el enraizamiento de los explantes.

El costo para el rubro de insumos directos fue de 1737,57 dólares, como se muestra en la tabla 3.37.

Tabla 3.37. Determinación del costo de insumos directos para cabuya blanca.

Insumos	Unidad	Cantidad	Valor/unidad (USD)	Valor total (USD)
Medio M&S SIGMA	L	258,24	1,70	439,00
Ácido Indol acético (AIA)	g	0,001	25,80	0,01
Ácido naftalenacético	mg	158,42	0,40	63,37
Agar	g	1807,67	0,28	506,15
Agua destilada	L	438,84	0,30	131,65
Benciladenina (BA)	mg	491,47	0,03	14,74
Sulfato de Adenina	g	20,66	4,52	93,38
Tiamina	g	0,10	2,48	0,26
Mio-inositol	g	25,82	0,75	19,37
Azúcar	kg	7,75	0,80	6,20
Agua de Coco	L	12,91	2,14	27,63
Alcohol 70%	L	59,40	2,11	125,33
Hipoclorito de Sodio (5,25%)	L	0,46	1,25	0,58
Tween 20	ml	93,75	0,10	9,38
Hipoclorito de Calcio	g	2307,69	0,01	20,98
Detergente	g	60,00	0,003	0,15
Mandil	Unidad	1,00	8,00	8,00
Marcadores	Unidad	2,00	2,00	4,00
Tijeras	Unidad	1,00	2,00	2,00
Cinta autoclavable	Rollo	3,00	10,00	30,00
Fundas	Unidad	250,00	0,01	2,50
Guantes	Par	55,00	0,65	35,75
Hoja Bisturí	Unidad	190,00	0,20	38,00
Jabón Líquido	L	4,00	2,50	10,00
Papel Absorbente	Paquete	15,00	1,90	28,50
Papel Aluminio	Paquete	11,00	4,00	44,00
Servilletas	Paquete	4,00	1,06	4,24
Zapatos	Unidad	1,00	30,00	30,00
Rolopac	Paquete	10,00	3,20	32,00
Mascarilla	Unidad	52,00	0,20	10,40
			Total	1737,57

Los costos de depreciación para los materiales del laboratorio, se detallan en la tabla 3.38. El costo por año se determinó a partir de la relación entre el costo de los materiales y su vida útil en años. El costo del uso de los materiales se estableció a partir del costo año, para la producción de plantas de cabuya blanca *in vitro*, en un año. Se obtuvo para este rubro un valor de 709,30 dólares.

Tabla 3.38. Determinación del costo de depreciación para los materiales de laboratorio para cabuya blanca.

Materiales	Unidad	Costo Unitario (USD)	Cantidad	Costo total (USD)	Vida útil (años)	Costo uso (USD)
Barras Magnéticas	Unidad	3,00	2	6,00	3	2,00
Espátula	Unidad	4,00	1	4,00	2	2,00
Mangos de Bisturí	Unidad	15,00	2	30,00	3	10,00
Mecheros de Alcohol	Unidad	4,00	1	4,00	2	2,00
Pinzas	Unidad	20,00	2	40,00	3	13,33
Pipeta 10 ml	Unidad	2,00	1	2,00	2	1,00
Pipeta 1ml	Unidad	1,89	1	1,89	2	0,95
Probeta Graduada 500ml	Unidad	16,40	1	16,40	2	8,20
Probeta Graduada 25ml	Unidad	6,30	1	6,30	2	3,15
Frascos de vidrio	Unidad	0,40	5000	2000,00	3	666,67
TOTAL						709,30

El costo directo de maquinaria y equipos se determinó a partir de la relación entre el costo de este, su vida útil y porcentaje de utilidad, para los 365 días al año. El costo del uso de las maquinarias y equipos se estableció a partir del costo día, por los días utilizados, para la producción de plantas de cabuya blanca *in vitro*, en un año. Se obtuvo para este rubro un valor de 619,30 dólares. Los costos de depreciación para maquinarias y equipos se detallan en la tabla 3.39.

Tabla 3.39. Determinación del costo de depreciación para maquinarias y equipos para cabuya blanca.

Equipo	Unidad	Costo (USD)	Vida útil (años)	Porcentaje de utilidad	Costo día (USD)	Días utilizados	Costo uso (USD)
Agitador magnético	Unidad	432	7	100,00%	0,17	70,15	11,86
Autoclave	Unidad	900	5	100,00%	0,49	79,7	39,30
Balanza de precisión	Unidad	2500	7	100,00%	0,98	73,75	72,16
Cámara de flujo laminar	Unidad	12500	10	50,00%	1,71	153,3	262,50
Dispensador de medio	Unidad	100	5	100,00%	0,05	73,75	4,04
Estufa	Unidad	1500	10	100,00%	0,41	9	3,70
Microondas	Unidad	170	7	100,00%	0,07	73,75	4,91
pH-metro	Unidad	760	5	100,00%	0,42	73,75	30,71
Refrigeradora	Unidad	600	10	50,00%	0,08	65,75	5,40
Cámara de crecimiento	Unidad	3750	10	50,00%	0,51	359,56	184,71
TOTAL							619,30

El detalle de los costos de los suministros para la producción de plantas *in vitro* a escala piloto, se puede observar en la tabla 3.40, donde se estimó el consumo anual de acuerdo a los equipos que existen en el laboratorio y su tiempo de utilización. El valor para este rubro es de 1016,41 dólares.

Tabla 3.40. Determinación del costo de suministros de producción para cabuya blanca.

Suministro	Unidad	Consumo anual	Valor unidad (USD)	Valor Total (USD)
Luz	kWh	8961,17	0,08	716,89
Agua	m ³	768,00	0,39	299,52
TOTAL				1016,41

El costo de mano de obra directa se presenta en la tabla 3.41. Se requiere de un operario a tiempo completo. El costo total es de 3886,2 dólares para este rubro.

Tabla 3.41. Determinación del costo de mano de obra directa para cabuya blanca.

Personal	Unidad	Sueldo mensual (USD)	Cantidad	Valor total (USD)
Operario	Mes	323,85	12	3886,2
TOTAL				3886,2

El costo total de producción para obtener 13000 plantas de cabuya blanca en un periodo de un año, para el presente estudio es de 8367,22 dólares, como se observa en lo determinado en la tabla 3.42.

Tabla 3.42. Determinación del costo de producción para cabuya blanca.

COSTO DE PRODUCCIÓN	(USD)
Insumos directos	1737,57
Maquinaria y equipos	619,30
Materiales de laboratorio	709,30
Suministros	1016,41
Personal	3886,20
Suman	7968,78
Valor total del costo de producción	7968,78
Imprevistos (5%)	398,44
COSTO TOTAL DE PRODUCCIÓN	8367,22

El costo unitario de una planta *in vitro* de cabuya blanca enraizada se calculó a escala piloto, determinado en 0,64 dólares, para un rendimiento anual de 13000 plantas.

3.5. Plan de producción

El plan de producción teórico se realizó en base a los parámetros obtenidos en la presente investigación, tomando en cuenta el mejor tratamiento en las tres etapas de

análisis, y a la capacidad de producción del laboratorio de cultivo de tejidos de la estación Santa Catalina, INIAP; en ambas especies de cabuya (Tabla 3.43).

La tasa de multiplicación de cabuya azul fue el número de brotes obtenidos en el tratamiento de multiplicación T4, a la sexta semana de cultivo, con de 11 brotes. Con respecto al enraizamiento el mejor tratamiento presentó 91% de enraizamiento a los 30 días.

En cabuya blanca la proliferación se brotes se observó en la segunda transferencia⁵ (12 semanas) con una tasa de multiplicación fue 2,5 brotes. El porcentaje de enraizamiento fue de 100% los 30 días de incubación en el mejor tratamiento. En ambas especies, se consideró un valor de 10% como la tasa de contaminación en los sub-cultivos.

Tabla 3.43. Parámetros para le elaboración del plan de producción de las cabuyas.

Parámetros	<i>Cabuya azul</i>	<i>Cabuya blanca</i>
Demanda – Lote (Un año producción)	40 000 plantas	13 000 plantas
Intervalo de Transferencia	6 semanas	6 semanas
Tasa de multiplicación	11	2,5
Producción de vástagos	4000 por semana	4000 por semana
Porcentaje de enraizamiento	91%	100%
Tasa de trabajo del operador	2000 propágulos por semana	2000 propágulos por semana
Propágulos por recipiente	3	5
Tasa de contaminación	10%	10%
Volumen de medio por frasco	30 ml	30 ml
Cantidad de flujos laminares	3	3
Número de operadores	1	1
Número de turnos de trabajo	40 horas a la semana	40 horas a la semana

⁵ Multiplicación Cabuya blanca: Se realizó la segunda transferencia, valores que se pueden observar en el ANEXO 7, para determinar el mejor tratamiento (basado en el número de brotes) que nos permita elaborar el plan de producción y el análisis de costos.

En la tabla 3.44 se detalla el plan de producción para cabuya azul, el cual indica que al iniciar la etapa de multiplicación con 100 explantes, a la semana 19 de cultivo se establece la producción. A partir de esta semana se puede calcular el tiempo necesario (en semanas) para producir la demanda requerida.

Tabla 3.44. Plan de producción para cabuya azul.

Semanas	Número de propágulos establecidos	Número de frascos	Número de plantas no contaminadas (90%)	Número de plantas a liberar	Número de plantas enraizadas (91%)	Número de plantas a multiplicar	TM	Número de propágulos
1	100	100	90			90	11	990
7	990	330	891	709	645	182	11	2002
13	2002	667	1802	1620	1474	182	11	2002
19	2002	667	1802	1620	1474	182	11	2002

En la tabla 3.45 se especifica el plan de producción para cabuya blanca, el cual indica que al iniciar la etapa de multiplicación con 100 explantes, a la semana 37 de cultivo se establece la producción. A partir de esta semana se puede calcular el tiempo necesario (en semanas) para producir la demanda requerida.

Tabla 3.45. Plan de producción para cabuya blanca.

Semanas	Número de propagulos establecidos	Número de frascos	Número de plantas no contaminadas (90%)	Número de plantas a liberar	Número de plantas enraizadas (100%)	Número de plantas a multiplicar	TM	Número de propágulos
1	100	100	90			90	1	90
7	90	18	81			81	2,5	203
13	203	41	182			182	2,5	456
19	456	91	410			410	2,5	1025
25	1025	205	923	123	123	800	2,5	2000
31	2000	400	1800	1000	1000	800	2,5	2000
37	2000	400	1800	1000	1000	800	2,5	2000

CAPITULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Etapa I: Establecimiento *in vitro*

Los protocolos de desinfección empleados para la limpieza de hongos y bacterias, en cabuya azul (*A. americana*) y cabuya blanca (*F. andina*) se obtuvieron de trabajos realizados en especies de agaváceas.

4.1.1 Explantes contaminados

El material vegetal obtenido de campo por lo general presenta altos rangos de contaminación, según Roca y Mroginski (1991) es más difícil de desinfectar que explantes obtenidos de plantas de invernadero o cuartos climatizados. Los explantes de cabuya azul y cabuya blanca se obtuvieron de plantas de campo, por ende al realizarse la desinfección superficial en pruebas preliminares mediante los tres tratamientos evaluados se obtuvo altos porcentajes de contaminación en ambas especies, entre 25,0% a 92,3%. Para ello se realizó un pre-tratamiento, que consistió en la inmersión de los explantes primarios durante una noche en una solución de agua, detergente (2gL^{-1}) e hipoclorito de sodio (0,077%), donde se obtuvo un rango de contaminación de 0 a 20%.

En otras especies de agaváceas como *Agave tequilana*, Juárez *et al.* (2005) realizó la desinfección de las “piñas” (el cuerpo sin hojas ni raíces) mediante una solución de agua-detergente por 24 horas. Sin embargo, la presencia de hipoclorito de sodio (0,077%) durante aproximadamente 16 horas, puede ser muy drástico en la mayoría de plantas, dada su característica de oxidante potente pero muy efectivo en cuanto a desinfección. En ambas cabuyas, el ápice caulinar está protegido externamente por hojas jóvenes y rígidas (tienen fibras duras), actuando el hipoclorito de sodio solamente en la superficie del explante, ya que se observó oxidación y quemazón en la base del tallo y necrosis en las hojas

superficiales de los explantes primarios, antes de ser sometidos a los tres protocolos a ser evaluados.

La evaluación de los tres protocolos de desinfección en cabuya azul sugiere que los tratamientos descritos por Aureoles *et al.* (2008) y Martínez *et al.* (2006) son los mejores, al obtener 0% de contaminación al final de la evaluación. Sin embargo, a pesar de la inmersión de los explantes en una solución fungicida (benomilo) y antibiótica (sulfato de gentamicina y clorhidrato de oxitetraciclina) durante 30 minutos en el tratamiento modificado descrito por Blanco *et al.* (2004), fue evidente 10% de contaminación en los explantes debido a la presencia de hongos.

Contaminación que podría estar relacionada a la presencia de hongos endógenos adquiridos por la planta en su medio ambiente natural, ya que Ramírez *et al.* (2000), en su estudio “Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L.”, indica que los contaminantes pueden estar en la superficie como en el interior del explante, no obstante cuando se encuentran en el interior son más difícil de desinfectar, ya que según Kritzinger *et al.* (1998), los microorganismos endógenos no son eliminados por desinfección superficial, ya que no están expuestos a las sustancias desinfectantes. Estas investigaciones nos permiten suponer que hubo contaminación endógena, donde el fungicida benomilo utilizado en el protocolo modificado de Blanco *et al.* (2004) no eliminó este microorganismo debido a que se encontraba internamente en el explante, sin embargo la desinfección del 90% permiten establecer como un tratamiento efectivo para la desinfección superficial de los explantes.

En la desinfección de cabuya blanca, los tratamientos descritos por Martínez *et al.* (2006) y Blanco *et al.* (2004) son los más efectivos, al obtener 0% de contaminación. Sin embargo, el protocolo modificado de Blanco *et al.* (2004) utiliza antibióticos, que para Baran & Ghosh (2005) además de ser costosos pueden resultar tóxicos para los explantes, por ende se sugiere como mejor tratamiento al descrito por Martínez *et al.* (2006), ya que presenta igual eficiencia de desinfección mediante una metodología menos costosa. El tratamiento con los más altos porcentajes de contaminación es el descrito por Aureoles *et*

al. (2008), con 20% de explantes contaminados por la presencia de hongos y bacterias. Este tratamiento es el menos recomendable para la desinfección de los explantes para cabuya blanca.

En general, en ambas especies se presentó bajos porcentajes de contaminación que estuvo relacionada a una eficiente desinfección superficial, tanto con el pre-tratamiento como los tres protocolos evaluados, esto se debe, según Pérez (1998), a que los ápices se encuentran protegidos por primordios foliares y por las primeras hojas en desarrollo, que generalmente se encuentran asépticas, lo cual sugiere que una adecuada desinfección del explante primario (que corresponde a las hojas maduras y parte del tallo) permite aislar el ápice caulinar en un medio nutritivo bajo condiciones asépticas.

4.1.2 Explantes vivos

El método de desinfección superficial debe remover todos los microorganismos con un mínimo de daño al explante a ser cultivado (Dodds & Roberts, 1990). En ambas cabuyas, el porcentaje de explantes vivos fue de 100% en los tres tratamientos de desinfección. La protección que recibió el ápice caulinar por parte de las hojas jóvenes que cubren a este, permitió realizar la desinfección de la superficie del explante primario sin causar daños al ápice.

Tanto en cabuya blanca como en cabuya azul, los explantes contaminados a los 30 días de incubación se encontraban vivos, lo que se determinó visualmente en el color de las hojas de los explantes y su continuo crecimiento. Sin embargo, estos microorganismos pueden competir ventajosamente con el explante por el medio de cultivo, ya que generalmente su crecimiento es más rápido y pueden producir metabolitos tóxicos para las plantas, donde finalmente el explante muere (Roca y Mroginski, 1991; Bhojwani & Razdan, 1996).

En ambas cabuyas, el porcentaje de explantes vivos no determinó el mejor tratamiento de desinfección, ya que estas especies no presentaron problemas de oxidación visible al ser cultivadas en un medio nutritivo y la sobrevivencia fue del 100%, lo cual sugiere que tanto el pre-tratamiento como los tratamientos evaluados fueron efectivos en el control exclusivamente de los contaminantes sin dañar los ápices caulinares a ser cultivados.

4.2 Etapa II: Multiplicación *in vitro*

En ambas especies de cabuya, se realizó la transferencia a la sexta semana de cultivo, tiempo menor al establecido al inicio de la investigación (8 semanas), debido a que se observó senescencia en las hojas del material vegetal.

La transferencia de los explantes a un medio nuevo a la sexta semana de cultivo nos permite mantener la cantidad necesaria de nutrientes para evitar estrés en el explante y por ende desacelerar procesos como la senescencia. Pues para Taiz y Zeiger (2006), el etileno aumenta la velocidad de senescencia de la hoja. Este compuesto es normalmente producido por todos los tipos de células, tejidos y órganos de la planta durante el cultivo, sin embargo la tasa de biosíntesis puede incrementarse si las células son sujetas a estrés de algún tipo (George *et al.*, 2008). Al cultivarse las cabuyas bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo durante seis semanas, solamente el medio de cultivo constituye el factor principal de estrés debido al consumo de los nutrientes.

4.2.1 Cabuya azul

4.2.1.1 Explantes regenerados

Durante la etapa de multiplicación, el porcentaje de explantes regenerados fue de 100% en los nueve tratamientos de multiplicación, resultados que sugieren que las

condiciones del cultivo como el medio nutritivo, la temperatura, la humedad y el fotoperiodo establecido permiten el normal crecimiento de los explantes.

El objetivo en la etapa de multiplicación es la proliferación de brotes, sin embargo los tratamientos: T5 (1 mgL⁻¹ KIN - 0,5 mgL⁻¹ ANA) y T7 (1 mgL⁻¹ de KIN - 1 mgL⁻¹ ANA), presentaron crecimiento de callosidades en la base de los explantes en todas las observaciones, formación que no son deseables debido a que las plantas procedentes de callos presentan diferentes grados de variación (Roca y Mroginski, 1991). La combinación entre la KIN y el ANA en los dos tratamientos, sugiere que a estas concentraciones, los reguladores de crecimiento inducen la formación de callos en cabuya azul. Nikan (1997) encontró que en explantes de rizoma y de tallo de *Agave sisalana* en concentraciones de 0,2 a 2 mgL⁻¹ de kinetina en combinación con 0,2 mgL⁻¹ de ANA tiene lugar la formación de callosidades.

La presencia de raíz por parte de algunos explantes fue otra respuesta no deseable en la etapa de multiplicación en cabuya azul, crecimiento que fue observado en los tratamientos T5, T6, T7, T8 y T9. De estos, los cuatro primeros tratamientos estaban formulados con la citoquinina KIN (1-3 mgL⁻¹) y la auxina ANA (0,5-1mgL⁻¹). Según George *et al.* (2008) a concentraciones altas de citoquinina de 0,5-10 mgL⁻¹, generalmente se inhibe tanto la formación de la raíz como los efectos de las auxinas en la iniciación del enraizamiento. En otras investigaciones en especies de agaves, como *A. inaequidens* Koch, el uso de KIN (entre 3 y 10mgL⁻¹) favoreció el desarrollo de raíces (Aureoles *et al.*, 2008) y se señala que este comportamiento pudo ser resultado del efecto nulo por parte de la KIN y la formación de raíces como consecuencia de la producción de auxinas por la misma planta.

El crecimiento de raíz también se observó en ausencia de reguladores de crecimiento en el tratamiento T9 ó control, lo cual sugiere la producción de auxinas endógenas por parte de la plántula, ya que naturalmente las plantas producen auxinas como el AIA, síntesis que ocurre principalmente en tejidos de rápido crecimiento y división como meristemos apicales de los tallos (Taiz y Zeiger, 2006).

4.2.1.2 Explantes con brotes

El porcentaje de explantes con brotes mostró asociación con los tratamientos de multiplicación ($p < 0,0001$), analizado mediante el estadístico Chi-cuadrado; donde los tratamientos T1, T2 y T4 con 100%, y T6 con 80% de explantes con brotes, constituyen los valores más altos alcanzados en esta etapa.

La presencia de brotes en los tratamientos T1, T2 y T4 está directamente relacionada con la citoquinina BA, en combinación con la auxina ANA, reguladores de crecimiento presentes en los tres medios de multiplicación. En este sentido, el uso de la citoquinina BA fue corroborado por Domínguez *et al.* (2008), quien al investigar cinco citoquininas, la única que indujo brotes en cinco especies de agaves mexicanos en concentraciones de 0,5 a 3 mgL^{-1} fue la BA. Sin embargo, el tratamiento T3 compuesto de ambos reguladores presentó 0% de explantes con brotes. La diferencia se encuentra en que el T3 está formulado en proporción 1:1 (BA:ANA), mientras que los tratamientos T1, T2 y T4 con mayor concentración de BA a ANA, concluyendo sugiriendo que el porcentaje de explantes con brotes en cabuya azul es 100% cuando existe mayor proporción de citoquinina a auxina, lo que según George, citado por Martínez y Pacheco (2006), promueve el desarrollo de brotes.

El tratamiento T6 compuesto de KIN (3 mgL^{-1}) y de ANA (0,5 mgL^{-1}) se encuentra entre los tratamientos que presentaron alto porcentaje de explantes con brotes. En otras especies de agave como *A. potatorum*, esta citoquinina a la concentración de 3 mgL^{-1} igualmente favoreció la formación de brotes (Domínguez *et al.*, 2008a).

4.2.1.3 Número de brotes por explante

Los mejores tratamientos de proliferación de brotes, con diferencia significativa ($p < 0,0001$), para la multiplicación *in vitro* de cabuya azul fueron T4, T2 y T1, medios de cultivo donde la concentración de BA fue mayor en proporción a la del ANA, como se

mencionó anteriormente. El tratamiento T4 obtuvo 11,4 brotes a las seis semanas de cultivo, el mayor número alcanzado en los nueve tratamientos, seguido de T2 con 6,0 brotes y T1 con 3,8 brotes.

Los resultados confirman que la citoquinina BA resulto ser eficiente en la proliferación de brotes en explantes de cabuya azul (*Agave americana*). Esta respuesta concuerda con las obtenidas en el cultivo *in vitro* de agaves como *A. inaequidens* Koch, *A. cocui* Trelease, *A. tequilana*, *A. cupreata*, *A. Karwinskii*, *A. salmiana*, *A. duranguensis*, *A. victoria-reginae*, *A. pigmaea*, *A. grijalvensis*, *A. parrasana* (Aureoles *et al.*, 2008; Salazar *et al.*, 2009; Domínguez *et al.*, 2008a; Ramírez *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2008; Santacruz *et al.*, 1999).

Además, la comparación entre los tres mejores tratamientos, indica que el número de brotes podría también estar afectado por la concentración de BA, debido a que el mayor número de brotes se observó en los tratamientos donde la concentración fue de 3mgL^{-1} (T4 y T2). En este sentido, en explantes de *Agave inaequidens* Koch (Aureoles *et al.*, 2008), el número de brotes tuvo relación directa con la concentración de los reguladores (BAP, Kin ó 2ip), sin embargo, según Domínguez *et al.* (2008a) bajos niveles de citoquininas ($0,5\text{mgL}^{-1}$ a $3,0\text{mgL}^{-1}$) y sin auxinas permite disminuir la variación somaclonal, lo cual es deseable cuando se busca propagar masivamente.

El bajo número de brotes obtenidos en los tratamientos compuestos de la citoquinina KIN ($1-3\text{mgL}^{-1}$) en combinación con el ANA, muestra que la KIN a tales concentraciones no es recomendable para la propagación masiva de cabuya azul. Resultados similares se observaron en *A. difformis* y *A. karwinskii*, donde se probaron concentraciones de 1 a 3mgL^{-1} de KIN (Domínguez *et al.*, 2008a).

Con respecto a la eficiencia de los tratamientos, el mayor número de brotes obtenidos por explante fue de 11,4 en el tratamiento T4. En otras especies de agaves se reportó valores cercanos como en *A. oscura* con 13 brotes por explante alcanzado en presencia de $0,049\text{uM}$ de IBA y $4,44\text{uM}$ de BA (Ramírez *et al.*, 2008), y en *A. cupreata*

con 10,5 brotes con 6,66 μM ($1,5 \text{ mgL}^{-1}$) de BA (Domínguez *et al.*, 2008a); lo cual indica que el T4 en *Agave americana* es el adecuado para la proliferación brotes con respecto a otras especies y tratamientos, donde se obtuvo brotes si pasar por la etapa de formación de callo.

4.2.1.4 Tamaño promedio de brotes

La multiplicación tanto en cabuya azul como en cabuya blanca es mediante el desarrollo de brotes axilares y adventicios. La importancia de la longitud de los brotes en especies que se multiplican mediante este desarrollo se establece en que plántulas de pequeña longitud tienen la posibilidad de no proliferar y morir (Agrobiotecnología, 2011).

En los tratamientos que presentaron brotes, las plántulas alcanzaron medias de tamaños de 6,0 mm a 32,8 mm. A pesar de no existir diferencia estadística entre las longitudes promedios de los brotes ($p=0,3003$), el tratamiento T1 suplementado con 1 mgL^{-1} de BA y $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA, alcanzó el valor más alto de 32,8 mm. Trigiano & Gray (2005) manifiestan que la adición de auxinas en el medio, frecuentemente disminuye el efecto inhibitorio de las citoquininas en la elongación de los brotes, lo cual fue corroborado, ya que cuando la proporción citoquinina-auxina fue de 2:1, que corresponde al tratamiento T1, se alcanzó la mayor longitud, mientras que a proporciones mayores de citoquinina tales como 6:1 (T2) ó 3:1 (T4), la longitud de los brotes fue menor, sin embargo cuando esta fue 1:1, la formación de brotes fue inhibida; sugiriendo que el tratamiento T1 es aconsejable cuando se desee incrementar el número de brotes de suficiente tamaño para la etapa de enraizamiento, como lo menciona Trigiano & Gray (2005).

Robert *et al.* (2005) propone que en la micropropagación de agaves los brotes deber ser clasificados y separados por su tamaño, pequeño (0,5-1,0cm), mediano (1,0-2,0cm) y grande ($>2,0\text{cm}$), donde los dos primeros pueden ser transferidos a medio de multiplicación para continuar con la biomasa micropropagada o ser transferidos a medio de crecimiento, mientras que los brotes grandes pueden ser transferidos directamente a medio de crecimiento y pre-adaptación. Los tamaños promedios de los brotes de cabuya azul

obtenidos (0,60-3,28cm) se encuentra dentro de los rangos de clasificación, donde un manejo adecuado permitirá continuar con posteriores sub-cultivos y establecer un plan de producción.

4.2.2 Cabuya blanca

4.2.2.1 Explantes Regenerados

El porcentaje de explantes regenerados fue de 100% en los nueve tratamientos de multiplicación, lo que implica que las condiciones controladas de temperatura, humedad y fotoperiodo permitieron el normal crecimiento de los explante, además del medio de cultivo que constituye la fuente de nutrientes. En investigaciones de multiplicación *in vitro* realizadas es especies de agaváceas a partir de tejidos meristemáticos, esta variable no ha sido considerada.

El motivo de analizar esta variable se debe a que tanto en cabuya blanca, como en cabuya azul al inicio de la etapa de multiplicación, se desarrolló la técnica de corte longitudinal del ápice descrita por Sandoval (1991) en la propagación *in vitro* de banano cuyo objetivo es evitar la dominancia apical al herir al meristemo para estimular la multiplicación. Sin embargo Sandoval (1991) manifiesta que existe la posibilidad de que el explante se deshidrate, al no estar el área del explante donde se realizó el corte en contacto con el medio, y por tanto perder la capacidad de regeneración. Los resultados sugieren que en ambas especies esta técnica puede ser aplicada satisfactoriamente.

4.2.2.2 Explantes con brotes

En contraste con cabuya azul (*A. americana*), los explantes de cabuya blanca (*F. andina*) al mismo tiempo de cultivo presentaron deficiente número de plántulas con brotes, esta respuesta diferente en ambas especies a los mismos tratamientos de multiplicación y

explantes, puede ser debido a las concentraciones endógenas de los reguladores de crecimiento en cada planta, ya que Smith (2000) y Salazar *et al.* (2009) manifiestan que los niveles de estas sustancias varían para cada especie, lo cual además del factor genético, está dado por la procedencia de los explantes, la condición fisiológica como por las condiciones de crecimiento de las plantas.

A pesar de los bajos porcentajes de explantes con brotes, a la sexta semana de cultivo el tratamiento T2, compuesto de 3 mgL^{-1} de BA en combinación con $0,5 \text{ mgL}^{-1}$ de ANA, presentó el mayor porcentaje de brotes de 33,3%. En *F. macrophylla* Baker a iguales concentraciones de BA y ANA se obtuvo 72% de explantes con brotes axilares después de ocho semanas de cultivo (Martínez y Pacheco, 2006), reafirmando que cada especie, incluso del mismo género, responde de manera diferente a los reguladores de crecimiento suministrados.

4.2.2.3 Número de brotes por explante

El número de brotes por explante en los nueve tratamientos de multiplicación muestran diferencia no significativa ($p=0,117$), a la sexta semana de cultivo, valor que se encuentra en un rango de 0,0 a 0,33 brotes, muy bajos en comparación a los obtenidos en cabuya azul. El tratamiento T2 presentó el mayor número de brotes por explante con 0,33.

La baja proliferación de brotes en los nueve tratamientos de multiplicación probablemente es una respuesta a los niveles endógenos de reguladores de crecimiento que tiene la planta, como también al tiempo necesario que esta especie requiere para alcanzar gran número de brotes, lo cual pudo ser corroborado en la presente investigación, ya que al realizarse el cambio de estos explantes a nuevo medio de multiplicación, en un segundo ciclo, el número de brotes aumento.

En el estudio realizado en una especie del mismo género, *Furcraea macrophylla*, la formación de brotes fue evidente después de ocho semanas de cultivo (60 d), en medios de multiplicación con mayor concentración de citoquininas (Martínez y Pacheco, 2006), lo

cual sugiere que para determinar el mejor tratamiento de proliferación se necesita aumentar el tiempo de cultivo en los medios de multiplicación, lo cual pudo ser corroborado en la segunda transferencia a los mismos medios de multiplicación, donde se obtuvo mayor número de brotes, alcanzando el mejor resultado en el tratamiento T2 con 2,5 brotes.

4.3 Etapa III: Enraizamiento in vitro

El porcentaje de enraizamiento, el número de raíces y el tamaño de la raíz son las bases para determinar un medio adecuado de enraizamiento para los brotes. La fase de enraizamiento *in vitro* permite la preparación de los brotes obtenidos de la etapa II, haciendo que su transferencia a suelo sea exitosa (Trigiano & Gray, 2005).

4.3.1 Cabuya azul (*Agave americana*)

4.3.1.1 Presencia de Raíz

El alto porcentaje de enraizamiento conseguido a final de la etapa, de 80,0% a 90,91%, sugiere que la especie *Agave americana* no presenta dificultades en cuanto a enraizamiento, corroborado por Roca y Mroginski (1991) para el género *Agave*.

A pesar de no existir diferencias significativas entre los medios evaluados, el tratamiento que obtuvo mayor porcentaje de enraizamiento fue el que estuvo compuesto de sales MS al 100% en ausencia de reguladores de crecimiento, ya que obtuvo 90,91% de presencia de raíz, estimulada por la síntesis de auxinas exógenas producida naturalmente por los brotes (Trigiano & Gray, 2005). En este sentido, Domínguez *et al.* (2008), encontró que en varias especies de agaves mexicanos (*A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwiskii*, *A. obscura* y *A. potatorum*) el enraizamiento pueden ser logrado exitosamente en un medio basal sin reguladores con eficiencias de 80% a 100% a los treinta días de incubación.

Aquellos explantes que no desarrollaron raíz a los treinta días de incubación, presentaron tejido calloso de coloración verde en la base de la plántula y/o presencia de brotes. Para Trigiano & Gray (2005), la resistencia a enraizar se debe a un alto nivel de citoquininas persistente en los brotes de previos tratamientos, lo cual pudo ser comprobado en la presente etapa por la proliferación de brotes por parte de ciertas plántulas en los medios de enraizamiento. Trigiano & Gray (2005) sugieren la transferencia de los brotes a un medio sin reguladores de crecimiento para permitir la disminución de los niveles de citoquininas.

4.3.1.2 Número de raíces

El número promedio de raíces en cabuya azul se encuentra en un rango de 3,20 a 4,20 raíces por brote. El análisis de la varianza determinó que no existe diferencia significativa entre los tres tratamientos de enraizamiento con respecto a esta variable. Sin embargo, al final de la etapa el medio adicionado con 11,42 μ M de AIA y el medio basal en ausencia de reguladores obtuvieron el mayor número con aproximadamente 4,2 raíces en ambos tratamientos.

La semejanza en el número medio de raíces, entre estos dos tratamientos nos sugiere que la producción endógena de auxinas por parte de las plántulas puede ser suficiente para la iniciación y crecimiento de raíces adventicias en cabuya azul en un periodo de 30 días de cultivo. Resultados similares se obtuvo en *A. parrasana* (Santacruz et al., 1999), *Agave sisalana* (Das, 1992), *A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwiskii*, *A. obscura* y *A. potatorum* (Domínguez et al., 2008), donde fue suficiente un medio basal para la producción de raíces.

En *A. inaequidens* se reportó 6,13 como el mayor número de raíces alcanzadas en un medio MS al 100% durante seis semanas (42 d) de cultivo (Domínguez et al., 2008a), valor cercano al obtenido en cabuya azul (4,2 raíces) durante 30 días. Esto no permite establecer como mejor tratamiento a E1-control, ya que los resultados obtenidos se encuentran en un nivel semejante a los tratamientos suplementados con auxinas, lo que favorece en una disminución de costos en cuanto a la etapa de enraizamiento *in vitro*.

4.3.1.3 Tamaño de raíces (mm)

El tamaño de la raíz en los brotes de cabuya azul en un periodo de 30 días de incubación, se encuentra en un rango promedio de 45,25 mm a 54,80 mm, donde no se observó diferencia significativa entre los tratamientos, en ambos periodos de evaluación. Sin embargo, al final de la etapa la mayor longitud alcanzada se observa en los tratamientos E3 y E1 (control), constituyendo los mejores tratamientos. Las medias de longitud de raíz obtenidas en cabuya azul se encuentran próximas a las obtenidas en la especie *A. inaequidens*, donde la longitud más alta fue 48,7 mm en un tiempo de seis semanas (Aureoles *et al.*, 2008).

4.3.2 Cabuya blanca (*Furcraea andina*)

4.3.2.1 Presencia de Raíz

La presencia de raíz en los brotes de cabuya blanca se presentó en la misma proporción en los tres medios de enraizamiento. A pesar de que los brotes obtenidos de cabuya blanca estuvieron en un periodo de multiplicación de 12 semanas (dos sub-cultivos), el efecto residual de los reguladores de crecimiento, no afectó la presencia de raíz, ya que se obtuvo 80% y 100% de enraizamiento, a los quince y treinta días respectivamente.

Resultados que se corroboran por Martínez y Pacheco (2006), quienes obtuvieron un porcentaje de enraizamiento en *F. macrophylla* de 90% a 100% en un medio de cultivo suplementado con AIA ó IBA, o en medio sin auxinas.

4.3.2.2 Número de raíces y tamaño de la raíz (mm)

Estadísticamente, el número de raíces y el tamaño de la raíz en plántulas de cabuya blanca no estuvo afectado por la presencia o ausencia de las auxinas IBA ó AIA en los medios de enraizamiento.

A pesar de no ser significativa la diferencia, tanto para el tamaño y cantidad de raíces, el medio compuesto de IBA ($0,5\text{mg L}^{-1}$) (E3), presentó los brotes que obtuvieron mayor número de raíces (2 y 3 raíces) a los 15 y 30 días de cultivo. No obstante, la mayor longitud de raíz se observó en este medio con 37,9 mm y en el control (sin reguladores de crecimiento) con 37,4 mm, al final de la etapa de enraizamiento. En algunas de agavácea como *Agave cocui* Trelease, *A. parrasana* Berger y *F. macrophylla* Baker, la auxina IBA ha sido empleada en la estimulación del sistema radical (Yépez *et al.*, 2001; Santacruz *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2006).

Tanto en cabuya blanca como en cabuya azul, la diferencia entre los tres medios de enraizamiento estudiados fue la presencia ó ausencia de ciertas auxinas. Los resultados indican que no existió diferencia estadística, en el factor medio de enraizamiento en relación a las variables analizadas, en la etapa III. Por ende, la diferencia de la composición del medio nutritivo podría afectar más bien a los costos de producción, ya que si se obtiene igual respuesta estadística sin la utilización de reguladores de crecimiento, se podría disminuir estos costos para el proceso total de obtención de una planta con sistema radical desarrollado.

4.4 Análisis Económico

4.4.1 Cabuya Azul

El costo unitario de una planta *in vitro* de cabuya azul enraizada, tomando en cuenta solo los costos directos de producción, a escala piloto es de 0,27 dólares. Este es un valor estimado para un rendimiento de 40000 plantas para el primer año de producción que fue calculado mediante la tasa de multiplicación (TM) del tratamiento que presentó mayor número de brotes (T4) y el plan de producción establecido tomando en cuenta los parámetros de la Tabla 3.45.

En general, el rubro que representó el mayor costo para la obtención de una planta de cabuya fue el personal que constituye aproximadamente el 35,5% (3886,2 dólares) del costo total de producción. Rubro que se encuentra relacionado con el rendimiento, es decir, un incremento en el número de plantas producidas de acuerdo a la capacidad del trabajador y a la superficie física del laboratorio, puede producir un decremento en el precio por planta. Según Agrobiotecnología (2011) un operario capacitado puede realizar entre 1600 y 2800 plantines diarios en una jornada de trabajo, rango que dependerá de la especie a ser micropropagada. Mejorar la capacidad del operador por lo tanto nos permite obtener mayores rendimientos y una mejor utilización de recursos que podrían contribuir a obtener precios más bajos.

4.4.2 Cabuya blanca

El costo unitario de una planta *in vitro* de cabuya blanca enraizada a escala piloto es de 0,64 dólares, tomando en cuenta solo los costos directos de producción. Este valor es mayor al obtenido en cabuya azul debido principalmente al menor rendimiento que se obtuvo en cabuya blanca, de 13000 plantas, la tercera parte del alcanzado teóricamente en cabuya azul, en el primer año de producción.

El rendimiento en cabuya blanca fue calculado mediante la tasa de multiplicación (TM) del tratamiento que presentó mayor número de brotes (T2) y el plan de producción establecido tomando en cuenta los parámetros de la Tabla 3.45. La TM que se utilizó fue la observada en la segunda transferencia de los explantes a nuevo medio de multiplicación, la cual fue de 2,5 brotes, factor que determinó el bajo rendimiento anual para esta especie.

Al igual que en cabuya azul, el rubro del operario constituye un valor representativo de aproximadamente el 46% del costo total. En ambas cabuyas, los costos obtenidos fueron considerando los mejores tratamientos para cada especie a nivel de laboratorio. Sin embargo, se debe señalar que las tasas de multiplicación en la presente investigación pueden variar al realizar un escalamiento del proceso y por ende los costos de producción.

Una de las razones por lo que puede existir variación es que a nivel de laboratorio, que constituye la etapa de investigación, se trabajó con un explante por frasco mientras que al realizar un escalamiento, el número de explantes por frasco debería estar en función a pruebas de productividad, donde el número de brotes podría disminuir.

4.5 Plan de producción

En la producción a gran escala, es necesario diseñar un plan de producción, que según Robert *et al.* (2005) debe estar en concordancia a la producción objetivo y a la capacidad del laboratorio; donde inicialmente un número de plantas son multiplicadas hasta alcanzar el número máximo deseado, manteniendo una biomasa constante de multiplicación en función a la capacidad operacional, ya que un incremento en la producción superior a esta capacidad podría ocasionar cuellos de botella y por ende causar un mal manejo del material a ser micropropagado.

4.5.1 Cabuya Azul

El plan de producción de cabuya azul determinó que al iniciar la etapa de multiplicación con 100 explantes inducidos, considerando un 10% de contaminación, una tasa de multiplicación de 11 brotes, con 91% de enraizamiento y el trabajo de un operador de 2000 propágulos por semana, en la semana 19 se establece la producción con 1474 plántulas enraizadas por semana, donde la biomasa constante a multiplicarse será de 182 plántulas.

En este plan, la tasa de trabajo del operador fija la producción semanal, es decir que se debe liberar plantas a enraizamiento para mantener un número menor o igual a 2000 propágulos semanales, que es la capacidad de un operador en el laboratorio de Cultivo de tejidos de la Estación Santa Catalina (INIAP). Sí se aumentara el personal se podría incrementar la producción semanal, sin embargo se debería analizar el incremento del costo

de producción, ya que como anteriormente se mencionó constituye un alto porcentaje en el costo total y por tanto de la planta. La tasa de multiplicación (TM) también permite establecer el plan de producción en menor tiempo, debido a que si la planta tiene menor o mayor TM, necesitará de mayores o menores sub-cultivos para llegar a la producción deseada.

4.5.2 Cabuya blanca

El plan de producción en cabuya blanca determinó que en la semana 37 se establece la producción con 1000 plántulas enraizadas por semana, donde la biomasa constante multiplicada es de 800 plántulas; plan obtenido de 100 explantes inducidos inicialmente, considerando un 10% de contaminación, una tasa de multiplicación inicial de 1 y de 2,5 en los siguientes ciclos, con 100% de enraizamiento y el trabajo de un operador de 2000 propágulos por semana.

Las diferentes tasas de multiplicación en ambas especies constituyen un factor decisivo en el tiempo de establecimiento del plan de producción, donde una alta tasa proliferativa (11 brotes) evita tres sub-cultivos (18 semanas) que son necesarios en cabuya blanca para llegar a su producción semanal límite. Los resultados en ambas especies muestran que la biomasa constante propagada aumenta cuando la tasa de multiplicación es menor, por tanto se obtiene menos cantidad de propágulos a enraizar. Se necesitará de mayor tiempo al estabilizar la biomasa necesaria para las continuas multiplicaciones.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

1. El éxito en la desinfección de explantes de cabuya azul y cabuya blanca estuvo dado por la implementación del pre-tratamiento, el cual consistió en la inmersión de los explantes primarios durante aproximadamente 16 horas en una solución de agua, detergente (2gL^{-1}) e hipoclorito de sodio (0,077%), donde se obtuvo un rango de contaminación de 0 a 20%.
2. Los mejores tratamientos de desinfección para cabuya azul (*Agave americana*), que alcanzaron 0% de contaminación y 100% de explantes vivos, fueron los descritos por Aureoles *et al.* (2008) y Martínez *et al.* (2006).
3. El mejor tratamiento de desinfección para cabuya blanca (*Furcraea andina*), que obtuvo 0% de contaminación y 100% de explantes vivos, sin la utilización de antibióticos, fue el descrito Martínez *et al.* (2006).
4. En cabuya azul, el número de brotes por explantes permitió establecer estadísticamente los mejores tratamientos de multiplicación, donde con diferencia significativa ($p < 0,0001$), los medios T1 (1 mgL^{-1} BA - $0,5\text{ mgL}^{-1}$ ANA), T2 (3 mgL^{-1} BA - $0,5\text{ mgL}^{-1}$ ANA) y T4 (3 mgL^{-1} BA - $1,0\text{ mgL}^{-1}$ ANA) alcanzaron el mayor número de brotes.
5. Una concentración de 3mgL^{-1} de BA en combinación con 1mgL^{-1} de ANA en un medio con sales Murashige & Skoog suplementado con 80 mgL^{-1} de sulfato de adenina, $0,40\text{ mgL}^{-1}$ de tiamina, 100 mgL^{-1} de myo-inositol, 0,7% de agar, 3% de azúcar y 5% de agua de coco, obtuvo el mayor número de brotes de 11,4 en la etapa de multiplicación *in vitro* de cabuya azul.
6. En cabuya blanca los nueve tratamientos de multiplicación analizados no resultaron favorables para la propagación de esta especie a gran escala, ya que el máximo número

de brotes obtenidos por explantes a la sexta semana de cultivo fue de 0,33, en el tratamiento T2 (3 mgL⁻¹ de BA y 0,5 mgL⁻¹ de ANA).

7. En ambas especies de cabuyas la citoquinina kinetina (Kin) no fue eficiente en concentraciones de 1mgL⁻¹ a 3mgL⁻¹ con respecto a la proliferación de brotes en la etapa de multiplicación, ya que en cabuya azul se obtuvo de 0,0 a 2,4 brotes y en cabuya blanca de 0,0 a 0,17 brotes por explante.
8. La inducción a la formación y crecimiento de raíces en cabuya azul estuvo favorecida en medio con sales M&S al 100%, suplementado con 80 mgL⁻¹ de sulfato de adenina, 0,40 mgL⁻¹ de tiamina, 100 mgL⁻¹ de myo-inositol, 0,7% de agar, 3% de azúcar y 5% de agua de coco, en ausencia de reguladores de crecimiento; al presentar 90,91% de enraizamiento, 4,18 raíces y 54,8 mm de longitud de raíz a los 30 días de incubación.
9. Cabuya blanca presentó mayor inducción a enraizamiento que cabuya azul, al obtener 100% de brotes con raíz a los 30 días de cultivo en presencia o ausencia de auxinas
10. Basado en la disminución de costos y la facilidad de enraizamiento de cabuya blanca, el mejor tratamiento de enraizamiento es el medio compuesto de sales M&S, suplementado con 80 mg L⁻¹ de sulfato de adenina, 0,4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 0,7% de agar, 3% de azúcar y 5% de agua de coco.
11. El precio de una planta de cabuya azul enraizada a escala piloto, obtenido mediante la estimación de los costos directos de producción basados en la capacidad operacional del Laboratorio de Cultivos de Tejidos de la Estación Santa Catalina (INIAP) es de 0,27 dólares.
12. El plan de producción estima que en un tiempo de 19 semanas se podría comercializar semanalmente 1474 plantas de cabuya azul enraizadas.
13. El bajo rendimiento anual teórico en cabuya blanca de 13000 plantas, debido al establecimiento del plan de producción en un tiempo de 37 semanas dado por una baja

tasa de multiplicación, incrementa los costo de producción, donde el precio de una planta de cabuya blanca enraizada a escala piloto es de 0,64 dólares.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

1. El pre-tratamiento de desinfección (agua-detergente-hipoclorito de sodio) por 16 horas resultó ser efectivo en cabuya blanca y cabuya azul, sin embargo en cabuya blanca (*Furcraea andina*) se presentó mayor oxidación superficial en los explantes primarios, por ello se recomienda probar en esta especie menor tiempo de exposición a este pre-tratamiento, como también ensayar concentraciones menores a 0,077% de hipoclorito de sodio, además se sugiere utilizar ápices caulinares provenientes de bulbillos para el establecimiento *in vitro* de esta especie, ya que en pruebas preliminares se obtuvo menor dificultad en cuanto a desinfección.
2. De igual manera, en cabuya blanca se recomienda probar concentraciones mayores a 3mgL^{-1} de BA en la etapa de multiplicación para encontrar una respuesta de brotación mayor a la obtenida en el presente estudio.
3. Un problema fisiológico observado en sub-cultivos de cabuya azul durante la etapa de multiplicación fue la vitrificación debido a ello se recomienda estudiar los siguientes factores: exceso de humedad, alta concentración de factores nutricionales, altos niveles de reguladores y baja intensidad luminosa en el medio de cultivo, que según Toro (2004) estos pueden ocasionar esta respuesta fisiológica.
4. Con la finalidad de disminuir el coeficiente de variación, se recomienda homogenizar el material vegetal, donde los explantes de cabuya a ser analizados sean brotes obtenidos de varios sub-cultivos en igual condiciones experimentales.
5. Se recomienda realizar estudios para la obtención y conservación germoplasma para contar con un material base con la finalidad de ejecutar trabajos de caracterización de la diversidad genética de las cabuyas, *Agave americana* L. y *Furcraea andina* Trel..

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

AA.VV. (2006). Botánica. Guía ilustrada de plantas. Más de 10000 especies de la A a la Z y cómo cultivarlas (pp. 66-68, 391). Barcelona: Könemann.

Abdelnour-Esquivel, A., Escalant J. V. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE

Agrobiotecnología (2011). Micropropagación comercial, (en línea). Consultado en 1 de jun. del 2011. Disponible de: <http://www.fbmc.fcen.uba.ar/materias/agbt/teoricos/teoricas-archivo-word/3%20-%20Cultivo%20de%20tejidos.doc/view>

Aguilar, S., Ramírez, J., Malagón, O. (2007). Extracción de fibras no leñosas: cabuya (*Furcraea andina* Trel.) y banano (*Musa paradisiaca* L.) para estandarizar un proceso tecnológico destinado a la elaboración de pulpa y papel. Revista Iberoamericana de polímeros, Vol. 8(2): Mar. 2007.

Anajwala, C., Patel, M., Dakhara, L., Jariwala, K. (2010). In vitro cytotoxicity study of *Agave americana*, *Strychnos nuxvomica* and *Areca catechu* extracts using mcf-7 cell line. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology Research Vol. 1 (2): Apr-Jun, 2010.

- Aureoles, F., A., Rodríguez, J., Legaria, J., Sahagún, J., Peña, M. (2008). Propagación *in vitro* del “Maguey bruto” (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés Económico. Revista Chapingo. Serie Horticultura 14(3): 263-269.
- Baran, T. & Ghosh, B. (2005). Plant tissue culture: Basic and applied. Himayatnagar (India): Universities Press.
- Béjar, E., Bussmann, R., Roa, C., Sharon, D. (2001). Herbs of Southern Ecuador: Ethnobotany, ecological data, traditional uses. California.
- Bhojwani, S. & Razdan, M. (1996). Plant tissue culture: theory and practice (Revised edition). The Netherlands: Elsevier.
- Blanco M., Valverde R., Gómez L. (2004). Micropropagación de *Dracaena deremensis*. Agronomía Costarricense Vol. 28(1): 7-15.
- Cerón, C. (2003). Sistemática, etnobotánica y métodos de estudio en el Ecuador. Quito.
- Chawla, H. (2004). Introduction to plant biotechnology (2da. ed.). Enfield (NH): Science Publishers, Inc.
- CORPEI (Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones). (2009). Perfil de Cabuya (en línea). Consultado en 2 de jul. de 2010. Disponible de: <http://www.ecuadorexporta.org/contenido.ks?contenidoId=10480>

- Correa, J. E., y Bernal, H.Y. (1989). Especies promisorias de los países del Convenio Andrés Bello (Tomo I, pp. 8-42). Santafé de Bogotá: Editora Guadalupe.
- CRT (Concejo Regulador del Tequila). (2011). Estadísticas. Consultado en 8 de jun. de 2011. Disponible de: <http://www.crt.org.mx/>
- Das, T. (1992). Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell Tiss. Organ Culture 31: 253-255.
- De La Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., y Balsier, H. (Eds.). (2008) Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador (pp. 150-151). Quito & Aarhus.
- Dodds, J. & Roberts, L. (1990). Experiments in Plant Tissue Culture (2da ed.). New York: University of Cambridge.
- Domínguez, M., Alpuche, A., Vascos, N., Pérez, E. (2008a). Efecto de las citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. Rev. Fitotecnia Mexicana 31: 317-322.
- Domínguez M., González M., Rosales C., Quiñones C., Delgadillo S., Mireles S., Pérez E. (2008b). El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. Investigación y ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes 41: 53-62.

- Eguiarte, L., Souza, V., Silva-Montellano, A. (2000). Evolución de la familia *Agavaceae*: Filogénia, biología reproductiva y genética de poblaciones. Boletín de la Sociedad Botánica de México 66: 131-150.
- Enríquez-del-Valle, J., Carrillo-Castañeda, G., Rodríguez-de-la-O, J. (2005). Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. Revista Fitotecnia Mexicana 28: 175-178
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación). (2009a). Boletín Especial No. 11 / Representación de la FAO en Cuba: Crónicas de las fibras. Renace el Sisal en Tanzania, (en línea). Consultado en 16 de ago. de 2010. Disponible en: <http://www.rlc.fao.org/es/prensa/boletines/pdf/47.pdf>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación). (2009b). Año internacional de fibras naturales (en línea). Consultado en 8 de jun. de 2011. Disponible en: <http://www.naturalfibres2009.org/es/aifn/index.html>
- FAO Memoria. (1994). Consulta de expertos sobre productos forestales no madereros para América Latina y el Caribe, Ejemplos de PFSM de importancia económica en Ecuador, (en línea). Consultado en 16 de septiembre del 2010. Disponible en: <http://www.fao.org/dozrep/t2354s/t2354s00.htm#Contents>
- George E., Hall, M., Geert-Jan De Klerk. (2008). Plant propagation by tissue culture 3rd edition Volume 1. Netherlands: Springer.

- González, G., Alemán, S., Trujillo, R., Keb, M., Abreu, E., Barredo, F., Robert, M., Ortiz, R., Cornides, M. (2004). El cultivo *in vitro* como alternativa de la recuperación henequenera (*Agave fourcroydes*). Biotecnología aplicada Vol. 21, No. 1.
- Grayum, M. (2003) Agavaceae. En: B. E. Hammel, N. Zamora & M. H. Grayum (Eds.). Manual de Plantas de Costa Rica. Vol. II. Gimnospermas y monocotiledóneas (*Agavaceae-Musaceae*). Monografía. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 92: 1-694.
- Gupta, M. P. (1995). 270 plantas medicinales iberoamericanas (pp. 7-9). Convenio Andrés Bello. Santafé de Bogotá.
- Jørgensen, P.M. & León-Yáñez S. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador (Vol. 75). Missouri: Missouri Botanical Garden Press.
- Juárez, R., Valenzuela, K., Sosa, M., Paredes, O. (2005). Una alternativa biotecnológica para la industria del Tequila Cultivo de callos de *Agave tequilana* Weber Var. Azul, VII Congreso Nacional de ciencia de los Alimentos (en línea). Consultado en 10 de enero de 2011. Disponible en: <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2005/ee-13-2005/index.html>
- Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E., Stevens, P., Donoghue, M. (2007). Plant Systematic: A Phylogenetic Approach (Third edition, pp. 268-269). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

- Kritzing, E. Jansen Van, R., Woodward, B., Rong, H., Spreeth, M., Slabbert, M. (1998). Elimination of external and internal contaminants in rhizomes of *Zantedeschia aethiopica* with commercial fungicides and antibiotics. Plant cell and organ culture 52: 61-65.
- León, J. (1987). Botánica de los cultivos tropicales: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (pp. 82-88). San José.
- Macía, M. (2006). Las plantas de fibra. En: M. Moraes, B. Øllgaard, L. Kvist, F. Borchsenius y H. Balslev. (Eds.). Botánica Económica de los Andes Centrales: 370-384.
- Madrigal, L., Pineda, E. y Rodríguez, J. (1990). Agave. En: P. Ammirato, D. Evans, W. Sharp, y Y. Bajaj (Eds.). Handbook of plant cell culture. Vol. 5. Ornamental species.(pp. 206- 227). New York: Mc Graw-Hill.
- Martínez, A. (2001). Saponinas esteroides. Medellín. Consultado en 8 de jun. del 2011.
Disponible de: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/saponinas2001.pdf>
- Martínez, M. y Pacheco, J. (2006). Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. Agronomía Colombia 24(2): 207-213.

MBW (Mexican Business Web). (2011). La tecnología alcanza al tequila en facturación (en línea). Consultado en 8 de jun. de 2011. Disponible de: <http://www.mexicanbusinessweb.com/noticias/estados.phtml?id=6004>

Mejía, R. (1994). Propagación comercial 312 especies de plantas por cultivo *in vitro*. Perú

Mroginski, L., Sansberro, P., y Flaschland, E. (2010). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales (en línea). Consultado en 19 de abril del 2011. Disponible en: www.biblioteca.org.ar/libros/150405.pdf

Nikan, T. (1997). High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. Plant cell, Tissue and organ culture 51: 225-228

Paredes, A. (1959). Especies medicinales del Ecuador (pp. 58-60). Quito: Universitaria.

Pérez. (1998). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de plantas. Cuba: Principal.

Ramírez, R., Borodanenko, Pérez, L., Salas, M., Núñez, H., Ochoa, N. (2008). *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. Plant Cell Tissue Organ Culture 94: 201-207.

- Ramírez, M., Santos, R., Isea, F. (2000). Hongos contaminantes en el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. Rev. Fac. Agron. (LUZ), 17: 217-225
- Razdan, M. (2003). Introduction to plant tissue culture (2da ed., pp. 22-31). New Hampshire: Science Publishers.
- Robert, M., Herrera, J., Contreras, F., Scorer, K. (1987). *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 8: 37-48
- Robert, M., Herrera-Herrera, J., Castillo, E., Ojeda, G., Herrera-Alamillo, M. (2005). An efficient method for the micropropagation of *Agave* species. En: Loyola-Vargas, V. y Vázquez-Flota, F. (Eds.). Plant cell culture protocols (2da ed., pp. 166-177). New Jersey: Humana Press.
- Roca, W., y Mroginski, L. (Eds.). (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Salazar, E., González, P., Hernández. (2009). Multiplicación *in vitro* de *Agave cocui* Trelease a través de yemas axilares. Agronomía Tropical 59(2): 129-135
- Salvador, M. (2003). Análisis de correspondencia (en línea). Consultado en: 22 de jun. de 2011. Disponible de: www.ciberconta.unizar.es/leccion/correspondencias/correspondencias.pdf

- Sánchez-Urbina, A., Ventura-Canseco, L., Ayora-Talavera, T., Abud-Archila, M., Pérez-Farrera, M., Dendooven, L., Gutierrez Miceli, F. (2008). Seed germination *in vitro* propagation of *Agave grijalvensis* an endemic endangered Mexican species. Asian Journal of Plant Sciences 7 (8): 752-756.
- Sandoval, J. A. (1991). Micropropagación de plátano y banano (Musa AAB, AAA) en el CATIE. Turrialba, C.R.: Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza (CATIE), Informe técnico No. 186.
- Santacruz –Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido, H., Rodríguez-Garay, B. (1999). Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 56: 163-167.
- Sathyanarayana, B. & Varghese, D. (2007). Plant tissue culture: Practices and new experimental protocols. New Delhi: I. K. International
- Silos-Espino, H., González-Cortés, N., Carrillo-López, A., Guevara-Lara, F., Valverde-González, M., Paredes-López, O. (2007). Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* “Gentry”. J. Hort. Sci. Biotechnol. 82: 355-359.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). Fisiología vegetal (Vol. I). Castelló de la Plana: Universitat Jaume-I.

Trigiano, R. & Gray, D. (Eds.). (2005). Plant development and biotechnology. New York: CRC Press.

Trópicos.org. (2011). Missouri Botanical Garden, *Furcraea andina* Trel. (en línea). Consultado en 4 de mar. de 2011. Disponible en: <http://www.tropicos.org/Name/1200282>

USDA (United States Department of Agriculture). (2011). *Agave americana* L. ssp. *americana* var. *americana* , American century plant (en línea). Consultado en 4 de mar. de 2008. Disponible en: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=AGAMA2>

Vargas, T., y García, E. (1996). Propagación clonal masiva de *Agave sisalana* (SISAL). Acta Biol. Venez 16(3): 39-44.

Yadav, P. & Tyagi, R. (2006). Biotechnology of plant tissue (pp. 32-40). New Delhi: Arora Enterprises.

Yépez, L., De García, E., Vargas, E. (2001). Notas preliminares sobre la propagación clonal *in vitro* de *Agave cocui* Trel.. Venezuela. Consultado en 19 de may. de 2010. Disponible de: http://investigacion.unefm.edu.ve/croizatia/trabajoscroizatia/volumen2.1/3_NO_TAS_PRELIMINARES_SOBRE.PDF