



UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CUENCA

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TEMA: Propagación “*in vitro*” del penco bicolor (*Agave americana*) para la flora urbana de la Ciudad de Cuenca

**TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

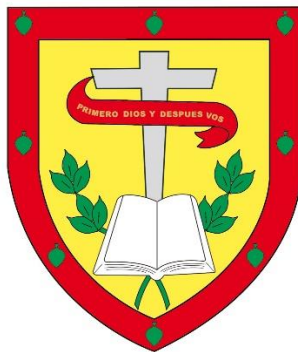
AUTOR: JESSICA PAULINA SANMARTÍN YUNGA

DIRECTOR: QF. NATHALIE CAMPOS MURILLO, MGS.

CUENCA - ECUADOR

2021

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS

AGROPECUARIAS

CARRERA DE INGENIERÍA AGRÓNOMICA

PROPAGACIÓN “IN VITRO” DE PENCO BICOLOR (AGAVE
AMERICANA) PARA LA FLORA URBANA DE LA CIUDAD DE
CUENCA

**TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERA AGRÓNOMA**

AUTOR: JESSICA PAULINA SANMARTIN YUNGA

**DIRECTOR: QF.NATHALIE DEL CONSUELO CAMPOS MURILLO
MGS.**

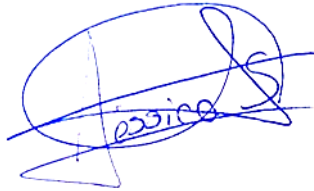
CUENCA - ECUADOR

2021

DIOS, PATRIA, CULTURA Y DESARROLLO

I. DECLARACIÓN

Yo, Jessica Paulina Sanmartín Yunga, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.



Jessica Paulina Sanmartín Yunga

II. CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Jessica Paulina Sanmartín Yunga bajo mi supervisión.



QF. Nathalie Campos Murillo, Mgs.

DIRECTORA

III. DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación quiero dedicar a las personas que me acompañaron durante este largo proceso en especial a mi papá Fernando Sanmartín y a mi mamá Ruth Yunga quienes siempre me apoyaron para culminar con este trabajo.

También quiero dedicar a dos personas muy especiales como son mis abuelos Miguel Sanmartín y María Cruz Pañega quienes desde el cielo guían mis pasos.

IV. AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios quien con su bendición me dio fortaleza y salud para cumplir mi objetivo.

Un agradecimiento especial al centro de investigación CIITT quien me brindo todo el apoyo necesario para poder realizar este trabajo y en especial al Ing. Juan Carlos González por brindarme su valioso apoyo incondicional durante el proceso de investigación.

También quiero brindar un agradecimiento especial a la Ing. Lourdes Reinoso García, MBE y Tecg. Agr. Rebeca Méndez quienes me ayudaron en el proceso de campo.

Quiero dirigir un agradecimiento muy especial a mi directora de tesis quien me apoyo en la culminación exitosa de mi proyecto.

Un agradecimiento eterno a todos los docentes de la carrera de Ingeniería Agronómica de la universidad Católica de Cuenca.

V. ÍNDICE GENERAL

I. DECLARACIÓN	2
II. CERTIFICACIÓN	3
III. DEDICATORIA.....	4
IV. AGRADECIMIENTOS.....	5
V. ÍNDICE GENERAL.....	6
VI. ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS	8
VII. ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
VIII. ÍNDICE DE IMÁGENES.....	9
IX. RESUMEN.....	10
X. ABSTRACT	11
CAPÍTULO I	12
1. INTRODUCCIÓN	12
1.1 ANTECEDENTES.....	12
1.2 PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	14
1.3 OBJETIVOS	15
1.4 HIPÓTESIS	15
CAPÍTULO II	16
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1 EL CULTIVO DEL AGAVE AMERICANA (VARIEDAD BICOLOR)	16
2.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL AGAVE AMERICANA.....	17
2.3 CULTIVO DE TEJIDOS.....	17
2.4 IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	19
2.5 PRINCIPALES ENFERMEDADES	20
2.5.1 PLAGAS	21
2.6 CONTROL BIOLÓGICO	22
2.6.1 GENERALIDADES E IMPORTANCIA	23
2.7 HONGOS ANTAGONISTAS.....	25
2.7.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DE <i>TRICHODERMA</i>	26

2.8	MICROORGANISMOS ENDÓFITOS	28
2.8.1	KOSAKONIA COWANII	29
2.8.2	FUSARIUM SPP	29
2.9	TÉCNICA MALDI-TOF	30
2.10	MEDIOS DE CULTIVO	31
2.10.1	FACTORES QUE INCIDEN EN EL CRECIMIENTO IN VITRO	31
2.10.2	PROBLEMAS ASOCIADOS AL CULTIVO IN VITRO	32
2.10.3	CUIDADO EN EL MANEJO IN VITRO	35
2.11	EL EXPLANTE	35
2.12	REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES PARA LOS BROTES DE CALLOS DE LAS VITROPLÁNTULAS	37
2.12.1	ELEMENTOS MINERALES INORGÁNICOS	37
2.12.2	<i>ELEMENTOS ORGÁNICOS</i>	38
2.12.3	REGULADORES DE CRECIMIENTO	39
2.12.4	AGENTES GELATINIZADORES	40
2.12.5	POTENCIAL DE HIDRÓGENO	40
2.12.6	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	40
2.12.7	<i>AGAR, MURASHIGE Y SKOOG, KINETINA</i>	42
2.12.8	ESTERILIZACIÓN DE EXPLANTES	43
2.12.9	SIEMBRA DE EXPLANTES EN LOS MEDIOS DE CULTIVO	44
	CAPÍTULO III	46
3	METODOLOGÍA	46
3.1	UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	46
3.2	MATERIAL BIOLÓGICO	46
3.2.1	ESQUEMA GENERAL DEL PROCESO	47
3.3	ETAPA I: ESTABLECIMIENTO IN VITRO	47
3.4	ETAPA II: PROPAGACIÓN IN VITRO	50
3.5	ETAPA III: ENRAIZAMIENTO	51
	CAPÍTULO IV	52
4	RESULTADOS	52
4.1.1	EXPLANTES CONTAMINADOS	52
4.1.2	EXPLANTES VIVOS	53
4.2.1	EXPLANTES CON BROTES POR TRATAMIENTO	54

4.2.2	NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE.....	54
4.3	ETAPA III: ENRAIZAMIENTO	55
4.4	DISCUSIÓN.....	55
4.5	CONCLUSIONES.....	59
4.6	RECOMENDACIONES.....	61
4.7	BIBLIOGRAFÍA	

VI. ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

TABLA 1.	PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL AGAVE AMERICANO	21
TABLA 2.	PRINCIPALES PLAGAS DEL AGAVE AMERICANO.....	22
TABLA 3.	PRINCIPALES TIPOS DE TRAMPAS	24
TABLA 4.	TIPOS DE AGENTES DESINFECTANTES MÁS UTILIZADOS	43
TABLA 5.	MEDIOS Y SOLUCIONES.....	48
TABLA 6.	TRATAMIENTOS PARA LA DESINFECCIÓN IN VITRO DE EXPLANTES	49
TABLA 7.	TRATAMIENTO DE PROPAGACIÓN	50
TABLA 8.	EXPLANTES CON BROTES POR TRATAMIENTO	54
TABLA 9.	NÚMERO DE BROTES POR EXPLANTE	55

VII. ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. REALIZADA POR EL AUTOR EN LA CUAL DESCRIBE LOS PRINCIPALES MECANISMOS DE ACCIÓN	27
GRÁFICO 2. REALIZADA POR EL AUTOR EN LA CUAL DESCRIBE LOS ASPECTOS A CONSIDERAR PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO	36
GRÁFICO 3. REALIZADA POR EL AUTOR EN LA CUAL DESCRIBE EL ESQUEMA DEL PROCESO	47
GRÁFICO 4. REALIZADA POR EL AUTOR EN LA CUAL DESCRIBE LOS EXPLANTES CONTAMINADOS	53
GRÁFICO 5. REALIZADA POR EL AUTOR EN LA CUAL DESCRIBE LOS EXPLANTES VIVOS	53

VIII. ÍNDICE DE IMÁGENES

IMAGEN 1. MAPA DE UBICACIÓN GEOGRÁFICA LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA DE UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA EN LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS	46
IMAGEN 1. LAVADO DE PLANTAS PREVIO AL PROCESO DE DESINFECCIÓN.....	72
IMAGEN 2. ENJUAGUES CON TWEEN 20.....	72
IMAGEN 3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	73
IMAGEN 4. EXPLANTES PARA EMPEZAR EL PROCESO DE DESINFECCIÓN	73
IMAGEN 5. TRASPASO DEL ALCOHOL AL CLORO.....	74
IMAGEN 6. PROCESO DE CUARENTENA.....	74
IMAGEN 7. TRATAMIENTOS EN OBSERVACIÓN	75
IMAGEN 8. PLANTAS SANAS.....	75
IMAGEN 9. OBSERVACIÓN DE PRIMERAS PLANTAS INFECTADAS	76
IMAGEN 10. BROTES DE CALLOS.....	76
IMAGEN 11. EXPLANTES INFECTADOS	77

IX. RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la eficiencia de las técnicas de micro propagación in-vitro del penco bicolor (*Agave americana*), en la que se utilizaron 120 plántulas extrayéndose las yemas auxiliares. Los explantes introducidos in vitro se incubaron a 18,5°C durante 21 días, utilizándose 4 repeticiones. Durante la etapa de enraizamiento se utilizaron 4 tratamientos utilizándose el medio de cultivo Murashige y Skoog 4,4g/l, añadido con 4mg/l Ácido naftalenacetico (ANA) y 3 mg/l Kinetina y 12 g/l de agar para su solidificación. Los resultados obtenidos determinó que el mejor protocolo de propagación fue a través de la evaluación de los explantes con brotes por tratamiento y el número de brotes por explante, obteniéndose los porcentajes más altos de explantes con brotes en los tratamientos 2, 4 y 8 con valores de 50%, 10% y 20%, respectivamente; en cambio los tratamientos 10 y 1, presentaron 100% y 80% de incidencia de contaminación, en cambio, los tratamientos 1, 3, 5, 6, 7, 9 y 10 no presentaron explantes con brotes, además el conteo del número de brotes por cada explante se comprobó que el tratamiento con mayor brotes fue T2; mientras tanto los tratamientos T1, T3, T5, T6, T7, T9 y T10 no exhibieron brotes. Los explantes se sumergieron en tween al 20% por 10 min y se enjuagaron. Para la desinfección se introdujeron en alcohol al 70% y en cloro al 20% durante 10 minutos efectuándose tres enjuagues en agua destilada estéril y sembrándose posteriormente en el medio de cultivo.

Palabras claves

Hormonas, in-vitro, brotes, hongos, bacterias.

X. ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the efficiency of in-vitro micropropagation techniques of penco bicolor (*Agave americana*), in which 120 seedlings were used, extracting the auxiliary buds. The explants introduced in vitro were incubated at 18.5°C for 21 days, using 4 replicates. During the rooting stage, 4 treatments were used, using Murashige and Skoog 4.4 g/l culture medium, added with 4 mg/l naphthaleneacetic acid (ANA) and 3 mg/l kinetin and 12 g/l agar for solidification. The results obtained determined that the best propagation protocol was through the evaluation of explants with shoots per treatment and the number of shoots per explant, obtaining the highest percentages of explants with shoots in treatments 2, 4 and 8 with values of 50%, 10% and 20%, respectively; On the other hand, treatments 10 and 1 showed 100% and 80% incidence of contamination, while treatments 1, 3, 5, 6, 7, 9 and 10 did not show explants with sprouts. In addition, the count of the number of sprouts per explant showed that the treatment with the highest number of sprouts was T2, while treatments T1, T3, T5, T6, T7, T9 and T10 did not show any sprouts. The explants were immersed in 20% tween for 10 min and rinsed. For disinfection, they were placed in 70% alcohol and 20% chlorine for 10 min, rinsed three times in sterile distilled water and then seeded in culture medium.

KEYWORDS: HORMONES, IN-VITRO, SPROUTS, FUNGI, BACTERIA

CAPÍTULO I

1. Introducción

1.1 Antecedentes

Los bosques y la vegetación de la ribera de las cuencas de los ríos constituye un hábitat muy importante para la conservación de una gran biodiversidad de plantas y animales silvestres, además de otro factor de mayor importancia es la preservación de los ríos y quebradas y la protección de los taludes de los mismos (Minga & Verdugo, 2016).

El agave es más que una especie del reino vegetal; engloba historia, tradición, cultura y en muchos casos involucra un modo de vida y supervivencia para comunidades desde épocas ancestrales. En las zonas de Mesoamérica y Aridoamérica se originó y evolucionó el maguey. Esta planta ha sido utilizada por los primeros habitantes hasta hoy en día, para satisfacer necesidades básicas (Sánchez, 1993).

En América, la familia agavaceae es endémica, tiene 9 géneros y 330 especies. El punto de origen y variedad se encuentra en México, donde se sitúan 251 especies, el 70% son endémicas (García et al., 2004).

Para fomentar los emprendimientos y pequeños negocios relacionados a productos con base de agave, se han conformado asociaciones como la Asociación Nacional de productores de Agave del Ecuador (ANAGAVEC), la cual tiene como objetivo promover la cosecha de este tipo de plantas en tierras improductivas; por medio de estímulos económicos. Por ejemplo, tendrán un direccionamiento de economía solidaria, aquellas comunidades que cultiven en su territorio una parte mínima de esta especie (Rodríguez, 2018).

A inicios de 1980, alrededor del mundo, los entendidos en la materia empezaron a realizar investigaciones alusivas a la propagación in vitro de agaves, explicaron las condiciones que deben cumplir cada fase de micropropagación, como un método adicional que no descarta a los ya existentes (Arizaga & Ezcurra, 1995).

En la actualidad, existen informes que demuestran que la propagación in vitro de diferentes familias de agaves, entre ellas: *Agave tequilana*, *Agave angustifolia*, *Agave inaequidens* entre otras. Existen estudios de agaves poco profundizados con alto valor biológico y social (Cruz et al., 2019).

El agave al no demandar mucha agua, uno de sus usos contempla el aspecto ornamental, entre las cuales resaltan algunas variedades: *attenuata*, *filifera*, *potatorum*, *parryi*, *pumila*, *victoriae-reginae* (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2012). El agave es por excelencia es considerada como una planta ornamental debido a su excentricidad. Por lo regular se emplea en taludes o jardines grandes de cactus, además sirven como decorativos para macetas o tiestos (Espinosa, 2015).

La variedad *agave attenuata* se cultiva usualmente como planta de jardín, su estructura carente de dientes y espinas terminales la convierten esta en ideal para zonas colindantes a aceras (Rizwan et al., 2012). Por otro lado, el *agave salmiana* se utiliza en el ámbito ornamental y como cercas, parcelas o linderos en solares con el fin de cuidar a los cultivos y las residencias de animales e intrusos (Aguilar et al., 2014). Mientras que, el agave *victoriae-reginae* tiene como principal propósito el cultivo para uso de ornato, su belleza y popularidad es inusual. Las plantas adultas se comercializan a precios costosos a nivel mundial, sin embargo, tienden a varias dependiendo del tamaño, color y salud de las plantas (De Avila Ruvalcaba, 2019).

1.2 Problema y justificación

El *Agave americana* tiene diferentes usos industriales en la mayoría de sectores económicos. Por esta razón, desde el panorama mercantil, los tiempos de cosecha son muy extensos. Para la industrialización de la especie vegetal se debe esperar aproximadamente entre seis a ocho años. La planta es capaz de generar anualmente de uno a dos hijuelos; comúnmente, existe mucha variabilidad genética y segregación entre plantas hijas, respecto a las semillas. Otro problema presente es la obtención de las semillas vegetativas ; dado que, si la planta no alcanza la madurez, lo mismo ocurrirá con las semillas sexuales; de modo que, no serán apropiadas para la siembra (Fucikovsky, 2004).

Hace varios años, el agave se propagaba de forma asexual, motivo por el cual se realizaron varias investigaciones, respecto a la clonación de distintos genotipos seleccionados y se hallaron mínimas variaciones en las poblaciones cultivadas (Fucikovsky, 2004). Las herramientas de biotecnología vegetal permiten un mejor manejo del cultivo, micropropagación eficiente y eficaz; en otras palabras; en tiempos menores incrementa significativamente la producción de vitroplántulas, prevaleciendo las características fenotípicas de la especie y variedad (Espino et al., 2012).

En América Andina, la propagación del *Agave americana* se ejecuta dependiendo del fin, bajo ciertas ambientes controlados se emplea la técnica de reproducción por hijuelos, esto en casos en invernaderos. Cuando se utiliza el penco a niveles comerciales, se seleccionan las semillas viables, para cuestión de estudios, la micropropagación es la opción más habitual (Duque, 2013).

En México, se realizó una investigación asociada a una especie longeva (*Agave americana var. Oaxacensis gentry*), la cual tarda en llegar a su fase reproductiva alrededor de 20 años. La investigación, tuvo como finalidad analizar las particularidades morfológicas encontradas en las plantas micro propagadas, los resultados que obtuvieron fueron que aquellas plantas que fueron fertirrigadas con una solución nutritiva al 100%, incrementaron el tamaño en comparación con

las plantas que solo fueron irrigadas con agua (Cruz et al., 2019). Frente a esta situación, se realizará un estudio relacionado a la propagación in vitro de *Agave americana* (var. bicolor) con el propósito de evaluar las técnicas mencionadas en la propuesta de investigación.

1.3 Objetivos

Objetivo general.

Evaluar la eficiencia de las técnicas de micro propagación in vitro del penco variedad bicolor.

Objetivo específico.

- Determinar la eficiencia con dos hormonas ANA & KINETINA
- Estimar la eficiencia del tipo de explante del penco variedad bicolor.

1.4 Hipótesis

Las partes seleccionadas de las plantas crecen libres de bacterias u hongos y son las efectivas para la siembra en un cultivo in vitro.

CAPÍTULO II

2. Marco teórico

2.1 El cultivo del *Agave americana* (variedad bicolor)

El *Agave americana* es una planta perdurable, rizomática; usualmente se propaga por hijuelos los mismos que poseen raíces resistentes, además poseen un tallo robusto y corto, las hojas son de gran tamaño, el contorno está conformado con pequeñas espinas con forma de ganchos. Los capullos son escamosos, bracteadas y en forma de racimos. Pueden presentar bulbillos en las inflorescencias (Guerrero et al., 2006).

En Ecuador, el *Agave americana* se halla principalmente en la región interandina. Generalmente, las provincias donde se localiza el *Agave americana* es en Pichincha, Tungurahua, Cotopaxi, Azuay, Cañar, Bolívar, Loja, Carchi, Imbabura, Chimborazo, Guayas y Manabí. El agave fue introducido al continente Americano, debido a su alto contenido en azúcar en forma de fructosa en el núcleo de la planta; del mismo modo, se particulariza por sus beneficios en la fabricación de bebidas alcohólicas, artesanales, ornamentales, siendo considerada a nivel mundial como una especie silvestre (Duque, 2013).

La planta se ha desarrollado adecuadamente por las condiciones climáticas de la zona, este tipo de cultivo no emplea una siembra técnica, porque de acuerdo a las investigaciones no demanda mayores cuidados y se adapta a lugares secos, para la elección de la especie se debe valorar el color para distinguir a las plantas jóvenes, durante la cultivación del penco, se ha realizado deshierbes, lo cual implica separar las hojas secas y maleza (kikuyo, moras y otros) que la rodean con la ayuda de lampa, machete o podadoras (Allauca, 2011).

El agave forma parte de la familia de las agaváceas, que se congregan en el orden Asparagales. El género agave se encuentra integrada por 197 grupos; es decir: 136 especies, 26 subespecies, 29 variedades y 7 formas (García y Galván, 2017).

2.2 Clasificación taxonómica del *Agave americana*.

Reino: Plantae

Subreino: Embryobionta

División: Manoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Liliales

Familia: Agavaceae

Género: *Agave*

Especie: *atrovirens* Karw. Ex Salm-Dyck (Duque, 2013).

2.3 Cultivo de tejidos.

El cultivo de los tejidos es un conglomerado de técnicas y procedimientos que facilitan el cultivo de los mismos en ambientes asépticos (células, órganos, tejidos) siendo colocados en medios nutritivos artificiales, proporcionando un medio físico y químico óptimo, produciéndose en grandes cantidades de plantas en espacios reducidos, durante todo el año sin presencia de enfermedades. En la agricultura, se pueden aplicar varios métodos como: micropropagación, producción in vitro de metabolitos secundarios, preservación de germoplasma e ingeniería genética (Chen et al., 2014).

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.

Las técnicas de cultivo in vitro son utilizados para el mejoramiento genético, para obtener plantas libres de virus y patógenos, la conservación del germoplasma y en micropropagación, con este método se obtiene plántulas fenotípica y genotípicamente idénticas a la planta madre (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, 2002).

Otras ventajas que ofrece la micropropagación en comparación a las técnicas convencionales:

- Sistema de propagación clonal; en otros términos, sostiene todas las particularidades genotípicas del material inicial elegido.
- Se manejan los procesos en ambientes independientes controlados; por lo tanto, no influyen los cambios climáticos externos u otros factores ambientales.
- La cantidad de plantas que se alcanzar por este método es ilimitado.
- El tiempo que se requiere para obtener los resultados es aproximadamente corto y el espacio es mínimo.

Las plantas no presentan enfermedades (bacterias, hongos y nemátodos fitopatógenos). Sin embargo, existe un alto riesgo cuando se reproducen asexualmente por hijuelos, ya que pueden contener inicialmente patógenos que afecten a la planta madre (Domínguez et al., 2008).

Los Agaves se pueden reproducir mediante bulbos, los mismos que se desarrollan en los pedúnculos florales, en el tallo y entre una hoja y otra denominándose brote auxiliar, sin embargo para el *Agave americana* (var. bicolor) esta práctica no es muy frecuente, debido a que dichos brotes son muy escasos. En esta especie de agave, su método de reproducción es a través de los hijuelos que nacen de los rizomas de la planta madre, para posteriormente ser trasplantados cuando alcanzan 50 cm de alto y cuando el corazón tiene unos 15cm de ancho siendo la edad óptima para su reproducción entre los 3 y 5 años y puede dar anualmente entre uno y dos hijuelos (Duque, 2013).

La variación genética y la selección celular son procesos que se pueden realizar a nivel de laboratorio en lugar de utilizar grandes extensiones de suelo. A partir dicha innovación las plantas pueden ser clonadas con mayor rapidez in vitro

que en vivo, incrementándose en los últimos años la técnica de micropropagación (Pierik, 1987).

2.4 Importancia económica

El agave ha aportado de manera importante en el aspecto económico y cultural; en especial, para las comunidades indígenas y mestizas, Los beneficios que brinda esta planta son varios, tales como: alimentación, bebidas, medicina, cobijo, ornato, artesanías, vivienda, implementos agrícolas, entre otros (Masaquizá, 2014).

- **Alimentación y bebidas.**

En algunos casos los troncos se pueden consumir asados al igual que los tallos florales tiernos, los bulbillos y las flores también pueden ser ingeridos cocidos o asados. El aguamiel (savia de la planta) se disfruta extraída directamente como miel o azúcar, a través de un sinnúmero de procedimientos, permitiendo obtener bebidas estimulantes o fermentadas como el pulque, aceite, arrope, vinagre, bebidas alcohólicas como el mezcal y tequila (Pardo, 2005).

- **Medicina.**

Un gran abanico de usos medicinales que ofrece este penco, provienen desde la antigüedad y aún se mantienen hasta el día de hoy. Los beneficios se vinculan con los componentes bioactivos. Además ha sido utilizado como diuréticos, antimicrobianos, antiinflamatorios, antiedematosos, anticonceptivos y anticancerígenos. En los metabolitos secundarios del penco, se encuentran estántriterpenos, taninos, esteroides, cumarinas volátiles, alcaloides, flavonoides, derivados antracénicos libres, cardiotónicos y azúcares reductores (Kancab, 2016).

Se ha demostrado que el uso de la planta en la gastritis y úlceras, prebiótico (inhibe el crecimiento de bacterias patógenas), reduce los niveles de colesterol y triglicéridos, ayuda a eliminar las toxinas en el cuerpo, actúa en la tuberculosis pulmonar, enfermedades hepáticas, problemas en el cuero cabelludo u otros (Paneque et al., 2020).

- **Ornato.**

Para su utilizarla como planta ornamental se debe considerar la ubicación y las dimensiones que conlleva el espacio y evitar usar lugares donde pasen frecuentemente las personas para no causar daños directamente por las hojas puntiagudas. Normalmente, se adornan jardines rocosos, laderas, parques, hoteles, etc. (Abalos, 2001).

- **Flora urbana.**

La flora urbana compone una parte importante de la biodiversidad de dicha área, ya que posee una gran interacción ecológica con animales y plantas existiendo una simbiosis entre sí para su supervivencia, sin embargo este ecosistema se ven influenciado por las condiciones regionales y no locales ya que dicho espacio las plantas, animales e insectos se rigen por sus propias adaptaciones (clima, luz, lluvia, temperatura, etc.) y no por las impuestas por el hombre, además las áreas verdes se hallan pobladas por una gran diversidad de plantas exóticas lo que impide el desarrollo de especies animales nativas lo que impide el rescate de las plantas propias de la región, ya que dichas especies se hallan adaptadas a las condiciones ambientales de la región y además permiten la población de otras especies autóctonas (Rimay, 2004)

- **Artesanías.**

De las hojas se obtiene duras fibras, las cuales se secan al sol por varios días. Una vez secas se utilizan dieferentes propósitos como: sogas, alfombrillas, rodapiés, sacos, arpillera, alpargatas, bolsas de mano, cortinas, manteles y otras confecciones textiles (Pérez et al., 2016).

2.5 Principales enfermedades

El daño causado por enfermedades en las plantas, se visualiza de forma notoria, ya que es un efecto del desarrollo de microorganismos que habitan en ellas. Los patógenos adquieren los alimentos de los vegetales y generan sustancias

tóxicas que modifican de forma negativa el adecuado funcionamiento. Cuando la planta se defiende, la enfermedad no se extiende sino que sucumbe sola, pero en algunas ocasiones persiste y se vuelve letal. Por lo regular, el agave se ve afectado, primordialmente por el hongo *Fusarium oxysporum* y la bacteria *Erwinia carotovora*. El daño es producido por los patógenos solos o en conjunto; sin embargo, aún no se ha comprobado cual de los dos microorganismos es el más agresivo o cual inicia primero, ya que ambos patógenos están presentes en las plantas enfermas (Valenzuela, 2000).

Guillén (2003) reporta los siguientes fitopatógenos:

Tabla 1. Principales enfermedades del agave americano

Enfermedad	Término científico	Zona afectada
Anillo rojo	<i>Erwinia sp</i>	Hojas
Marchitez bacteriana	<i>Erwinia sp</i>	Hojas y piña
Pudrición de la raíz	<i>Fusarium oxysporum</i>	Raíces y piña
Pudrición de la raíz	<i>Phytophthora sp</i>	Raíces
Mancha Anular	<i>Didymosphaeria sp</i>	Hojas
Mancha foliar	<i>Botryodiplodia sp</i>	Hojas
Mancha negra foliar	<i>Rhizoctonia sotani</i>	Hojas
Viruela	<i>Pleospora sp</i>	Hojas
Virus	Virus no identificado	Hojas
Nemátodos	<i>Pratylenchus sp</i>	Raíces
Nemátodos	<i>Dorylaimus sp</i>	Raíces
Nemátodos	<i>Helicotylenchus sp</i>	Raíces

Fuente: Biocontrol de fusarium oxysporum y promoción de crecimiento por rizobacterias en agave. (Guillén, 2003)

En las plantas, el aumento de las enfermedades se ha potenciado por estos fitopatógenos, a causa de la baja variabilidad genética en el agave (Herrera et al., 2017).

2.5.1 Plagas

Los daños que exponen los insectos en el agave son: por alimentación directa y como vectores potenciales de enfermedades al crear umbrales para que ingresen los patógenos o importarlos directamente. Los daños más reiterativos en

el cultivo de agave, son plagas de raíz, plagas de la cabeza y de las hojas (Guillén, 2003).

Tabla 2. Principales plagas del agave americano

Nombre común	Término científico
Plagas de la raíz:	
Larvas de gallina ciega	<i>Anomala sp.</i> <i>Cíclocephala spp.</i> <i>Macroductylus spp.</i> , <i>Phyllophaga spp.</i>
Diabrotica	<i>Díabrotica spp.</i>
Plagas de la cabeza:	
Barrenador	<i>Acentroneme hisperiaris.</i>
Picudo o mayate negro	<i>Scyphophorus acunpunctatus</i>
Plagas de las hojas:	
Grana o cochinilla	<i>Dactylopius coccus</i> <i>Aonidiella sp.</i>
Escamas	<i>Lepidosaphes sp.</i>
Algodoncillo o piojo harinoso	<i>Planococcus harinoso</i>
Plagas del cogollo:	
Trips	<i>Frankliniella occidentalis</i> <i>Rhopalosiphum maidis,</i>
Pulgones	<i>Schizaphis graminum</i>

Fuente: Biocontrol de fusarium oxysporum y promoción de crecimiento por rizobacterias en agave. (Guillén, 2003)

2.6 Control biológico

El control biológico se fundamenta en el empleo de microorganismos que son antagonicos, que ocasionan antibiosis sobre el microorganismo infeccioso; también se considera como una técnica que permite controlar las enfermedades en las plantas e incluso con frecuencia se relaciona a que las rizobacterias impulsoras de crecimiento (PGPR) son un apoyo para proteger a las especies contra el ataque de fitopatógenos (Jiménez et al., 2001).

2.6.1 Generalidades e importancia

El control biológico de las enfermedades en las plantas abarca el uso de un organismo apto para controlar un patógeno, incorporando la utilización de plantas superiores y la resistencia genética de las plantas hospederas, este tipo de procedimientos se ha incrementado considerablemente en los últimos 65 años, especialmente con el empleo de microorganismos de la rizósfera, porque son un elemento esencial en la defensa entre fitopatógenos nativos del suelo y las raíces de las plantas (Schmidt, 1990).

Durante varios años, los antibióticos químicos y el cobre son las técnicas más usuales para controlar patologías en los cultivos, mientras que, los activadores y genes de resistencia en plantas son otro tipo de estrategias utilizadas para dominar diversas enfermedades bacterianas; empero, existen estudios que revelan resistencia al cobre en muchos microorganismos bacterianos, pocos bactericidas eficaces y algunos genes de resistencia a antibióticos codificados por plásmidos; por ello, se demandan nuevas alternativas para dominar las patologías, como: *bacteriocinas o bacteriófagos* (Lim et al., 2013).

Otras alternativas para el control de insectos perjudiciales como el picudo, se encuentran: el control cultural (derribo y eliminación a tiempo), control etológico (uso de trampas cebadas con tejido de las plantas impregnadas con insecticidas y feromonas de agregación para capturar a los insectos) y el control biológico, las técnicas mencionadas regulan las poblaciones de las plagas, evitando que los insectos no perjudiquen a los vegetales; mientras que, el control químico se encarga de acabar con las infestaciones en los agroecosistemas (Gobierno de México, 2017).

Krzyzanowska *et al.*, (2012) examinaron diversos agentes de biocontrol, valorando la idoneidad *in vitro* para impedir la evolución de por lo menos una cepa patógena e inactivar la *acil-homoserina lactona* (AHL) implicada en la propagación celular de *Pectobacterium*, la cual origina la pudrición blanda del agave; por otro lado, los agentes de biocontrol sobresalientes son: *Pseudomonassp* y *Bacillus sp.*, pese a que, gran parte de los aislados indujeron antibiosis *in vitro*, esto no asegura la eliminación de la enfermedad en la planta.

Otra estrategia para controlar las plagas que no implica riesgo de contaminación, es la utilización de agentes biológicos, entre ellos: parasitoides, depredadores y entomopatógenos que controlan a los insectos que perjudican al agave de manera natural; no obstante, se deben aplicarlos reiteradamente de forma inundativa para obtener mejores resultados en control del insecto, se han descubierto como agentes controladores biológicos de las larvas de picudo y de los parásitos del género *Alienioclypeus* y depredadores de los géneros *Lioderma* y *Hololepta* (Ruíz et al., 2017).

Han excluidos los nematodos y hongos entomopatógenos en adultos y larvas de picudo en plantaciones de *Agave americana*, el control biológico es fundamental por lo que no se deben administrar usualmente insecticidas y nematicidas; en cambio, los hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, se consideran agentes potenciales para el control de adultos (Ruíz et al., 2017).

Tabla 3. Principales tipos de trampas

Trampa con cebo alimenticio y atrayente (feromona) para <i>Scyphoporus acupunctatus</i>	Trampa con atrayente alimenticio	Trampa con pegamento o agua	Trampa de golpe
<ul style="list-style-type: none"> • Se instalan de 1 a 5 trampas por cada hectárea, recebando cada 15 días y cada 2 meses se sustituye la feromona por otra nueva. • Este tipo de trampas se mantienen durante todo el año. 	<ul style="list-style-type: none"> • Normalmente, se usan para escarabajo cerambícido, escarabajo rinoceronte, picudo y gallina ciega. • Los trayentes son: piña de agave, plátano, manzana o melaza combinados 	<ul style="list-style-type: none"> • Este tipo de trampas es útil para escama armada, adultos de piojo harinoso y lepidópteros (gusano blanco y barrenador de 	<ul style="list-style-type: none"> • Por lo regular esta trampa funciona para roedores, como la rata de campo. • Se coloca cerca de madrigueras, repartidas cada 20 m dentro de

<ul style="list-style-type: none"> El control químico se realiza con 5 o más capturas picudos/trampa. 	<p>o solos, y frutos maduros de piña.</p> <ul style="list-style-type: none"> Se ubica la trampa en el suelo o semienterrados para alcanzar los resultados esperados. 	<p>pencas del maguey).</p> <ul style="list-style-type: none"> Se localizan al menos 2 trampas (orilla y centro de la plantación). Se emplean dos elementos pegamento para insectos y/o agua enjabonada de acuerdo al caso. 	<p>la plantación.</p> <ul style="list-style-type: none"> Para que se obtenga una mayor efectividad debería combinarse con el uso de trampas cebadas con rodenticida.
--	---	--	---

Fuente: (CESAVEG, 2015)

2.7 Hongos antagonistas

Los hongos antagonistas hacen referencia a un conjunto de elementos de estado natural del suelo, los cuales se encuentran en la materia vegetal en descomposición, en particular en terrenos agrícolas; además se adaptan con facilidad a distintos ambientes (Gómez et al., 2013). Por otro lado, existen grupos importantes de antagonistas, los cuales se pueden potenciar y aprovechar en el control biológico, debido a que se obtienen de forma natural en la rizósfera, tales como: las micorrizas, los hongos, las bacterias y los actinomicetos (Almaraz et al., 2012). Entre los géneros relevantes se encuentran los *Trichoderma*, estos tienen una amplia acción contra los hongos fitopatógenos que son transmitidos por suelo y aire, empujándose en el campo e invernaderos. Del mismo modo, son los más

usados por sus características (ubicua, facilidad de aislarse y cultivarse) sin afectar a plantas superiores (Gómez et al., 2013).

De acuerdo, a los microorganismos originarios del suelo, *Trichoderma spp.*, actúa principalmente contra fitopatógenos nativos del mismo medio. Las circunstancias claves que favorecen el efecto antagonista de estos organismos son: acelerado crecimiento, producción de metabolitos antimicrobianos, propiedades bioquímicas, genéticas y características fisiológicas; no obstante, existen otras especies fúngicas que pueden inhibir o restringir el crecimiento de los patógenos, entre ellas se encuentran: *Arpergillus spp.*, *Gliocladium spp.*, *Penicillium spp.* y *Cladosporium spp.* (Velázquez, 2013).

La principal particularidad de las especies que corresponden al género *Trichoderma*, se centra en que son hongos saprófitos, anaerobios facultativos y poseen una mayor plasticidad ecológica. Este grupo hongos se hallan distribuidos en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la zona ecuatorial. La extensa distribución y la flexibilidad ecológica están directamente vinculadas con la capacidad enzimática de deteriorar los sustratos sumado a esto el metabolismo versátil y la resistencia a inhibidores microbianos (Infante et al., 2009).

2.7.1 Mecanismos de acción de *Trichoderma*

Con respecto a la función biocontroladora de *Trichoderma* se han identificado varios mecanismos de acción, los cuales se encargan de regular el desarrollo de los hongos fitopatógenos dianas. Entre ellos, se hallan como elementales la competencia por el área y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis, considerándose un efecto directo frente al hongo fitopatógeno. Los procesos se apoyan en la habilidad que posee el *Trichoderma* para colonizar la rizosfera de las plantas. Sin embargo, se ha valorado otros componentes causantes del papel biocontrolador, tales como: secreción de enzimas, producción de compuestos inhibidores, defensa fisiológicos y bioquímicos (compuestos de resistencia), detoxificación (toxinas excretadas por patógenos) y la solubilización de elementos nutritivos (Infante et al., 2009).

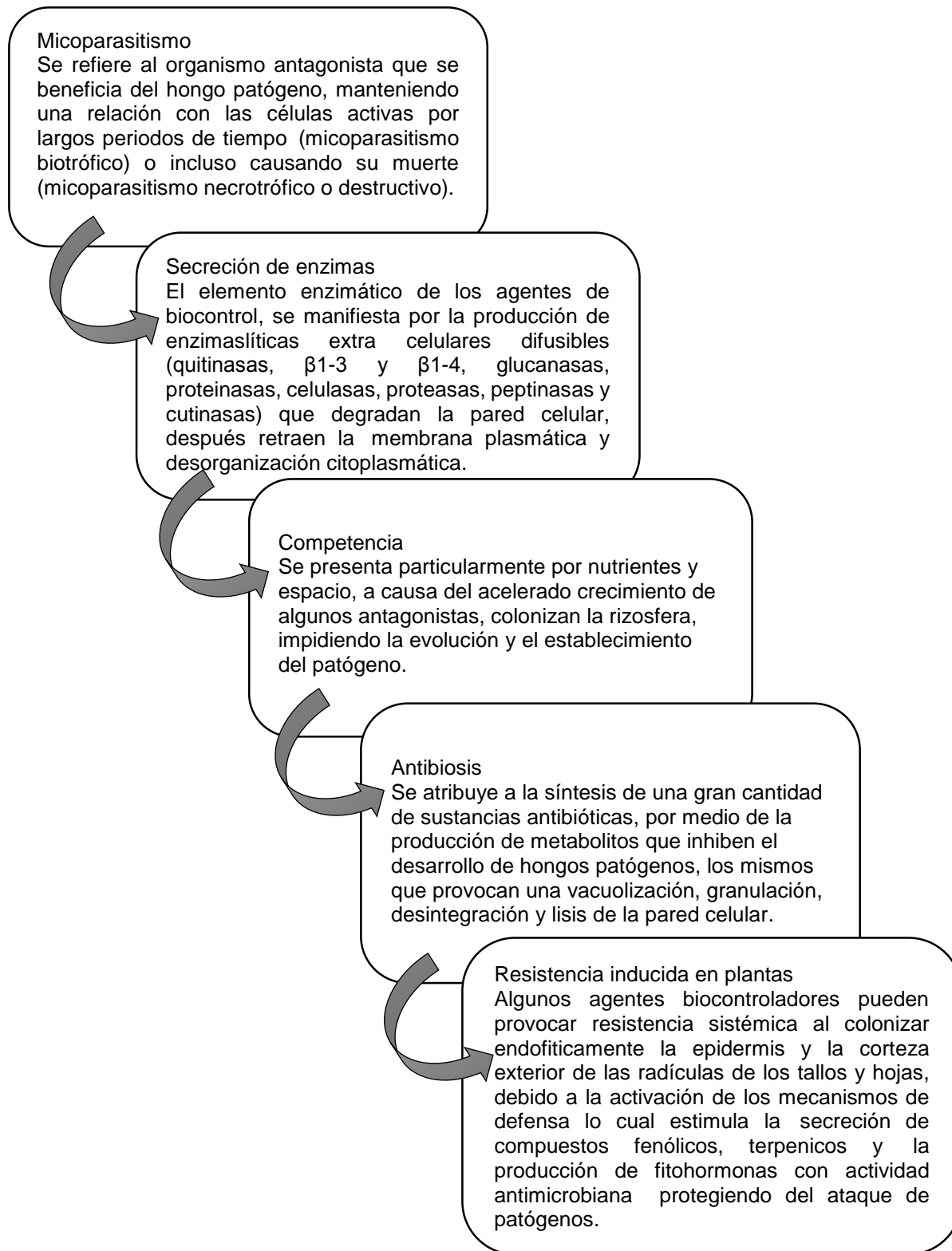


Gráfico 1. Realizada por el autor en la cual describe los principales mecanismos de acción

2.8 Microorganismos endófitos

La etimología del término endófito proviene del griego endon (dentro) y phyton (planta), alude los genomas microbianos hospedándose en distintas partes de la planta (semillas, raíces, flores, frutos y tallos), este proceso se propicia por transmisión vertical u horizontal, creando una sinergia en las interacción biológica con el fitohospedero de acuerdo a su estado fisiológico del vegetal, donde se consideran variables como: la temperatura, disposición de nutriente y pH (Schulz, 2006).

Los hongos endófitos son organismos microscópicos que gran parte de su periodo de vida se encuentran colonizando los tejidos de un vegetal hospedero, sin provocar afecciones visibles; en el caso del endofitismo la relación costo-beneficio no es obstructiva, los síntomas no son evidentes y es transitoria, además se precisa por localización y se determina en el interior de los tejidos de la planta nutricia, este tipo de microorganismos se encuentra presentes en todas las plantas; tales como: plantas acuáticas (algas), plantas vasculares, muscíneas y pastos; situadas en la zona ártica hasta la tropical, incluidas tierras agrícolas (Sánchez et al., 2013).

Los simbioses generan metabolitos secundarios con una elevada toxicidad, los endófitos pueden ser causales de virulencia (exoenzimas y metabolitos fitotóxicos); mientras que la planta afectada puede producir defensas mecánicas y químicas en defensa del agente invasor, por ende, para que los simbioses coexistan se determina un antagonismo equilibrado, el cual se encuentra en función del grado de patogenicidad del microorganismo y el mecanismo de defensa del huésped. Cabe señalar, si el hospedero presenta envejecimiento o se encuentra bajo estrés, el organismo microscópico se expone como infeccioso y la planta presenta evidencias de signos de enfermedad (Rodríguez et al., 2021).

En algunas situaciones, la condición saprófita del microorganismo endófito puede alterarse negativamente, cuando la planta presenta desequilibrios nutricionales o estrés hídrico, ocasionando una invasión del hongo, estos microorganismos son endófitos temporales o patógenos latentes pasarían de su

condición quiescente a patogénica cuando el ambiente sea adecuado para el huésped o desventajosa para la planta, existen circunstancias bajo ciertos ambientes, donde el microorganismo endófito logra actuar como agente infeccioso en diferentes condiciones ambientales dentro del mismo vegetal nutricio o en otra distinta (Rodríguez et al., 2021).

2.8.1 Kosakonia cowanii

Kosakonia cowanii hace referencia a una especie bacteriana reclasificada últimamente, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, anteriormente era conocida como *Enterobacter cowanii*, esta bacteria se caracteriza por ser anaerobia facultativa gramnegativa y móvil, su estructura es en forma de bastón y se encuentra usualmente en el suelo y el agua; asimismo en las plantas, animales y humanos.

Su gran particularidad de habitar en distintos ambientes y condiciones, la hacen muy competitiva y con un elevado potencial metabólico, con respecto a las aguas residuales el microorganismo se ha detectado como un elemento de los organismos formadores de biopelículas, en plantas se ha establecido como endofítica, en los animales se ha identificado su habitat en el intestino del mosquito tropical *Anopheles gambiae*, así como en el intestino de las abejas que hibernan bajo la nieve y en los seres humanos se han aislado varias cepas de las especies de *K. cowanii* y *K. radicincitans* a partir de muestras clínicas, que engloban sangre, orina, bilis y esputo.

El hongo es patógeno principalmente en las plantas, sin embargo, ha sido reconocido como un componente del filoplano de las plantas sanas; en la planta de eucalipto, las plantas leñosas, la soja y la cebolla se ha definido como patógeno real (Petrzik et al., 2021).

2.8.2 Fusarium spp.

El hongo *Fusarium* forma parte de *Phylum Ascomycota*, *Subphylum Pezizomycotina*, *Clase Sordariomycetes*, *Orden Hypocreales* y *Familia Nectriaceae*, se estima que dentro de este género oscilan más de 1.500 especies, para los

Fusarium spp. se encuentran presentes en el medio ambiente y se han identificado varias cepas que exponen patogenicidad para plantas o animales, generando micotoxinas (Arie, 2019).

Los microorganismos *Fusarium* se particularizan por ser ascomicetos filamentosos y cosmopolitas, poseen un micelio muy estructurado, septado y conidióforos particulares, se los encuentran comúnmente en el campo, debido a que suscitan un conjunto de patologías en los cultivos. Los daños provocan afecciones irreversible en la planta huésped, los síntomas de las enfermedades muestran marchitez, tizones y pudrición en ecosistemas agrícolas y naturales e incluso el hongo utiliza variadas estrategias de infección, este microorganismo puede subsistir en el suelo como micelio o como esporas sin necesidad de un anfitrión, cuando el hongo se halla cerca de una planta hospedera éste puede infectarla desde la raíz, y los órganos de la planta que se halla sobre el suelo o la infección también se puede dar por medio del aire o del agua; no obstante, para que sea exitoso el ingreso del hongo, éste debe seguir una fase en donde se deben fusionar una serie de conjuntos de genes para el ingreso al hospedero, la unión a la superficie del mismo, la desintegración enzimática de los obstáculos físicos, la protección e inactivación de los químicos antifúngicos del vegetal y la muerte celular del huésped provocado por las micotoxinas segregadas (Villa et al., 2014).

Por ello, una vez que los patógenos *fusaria* se propagan en el suelo agrícola, su erradicación es compleja. En la actualidad, este tipo de hongos se controlan mediante la fumigación con químicos como cloropicrina, agua caliente, solarización o con cultivares resistentes; empero, los resultados no son los esperados, por lo que se interviene con otros productos, considerando los efectos nocivos sobre el medio ambiente (Arie, 2019).

2.9 Técnica MALDI-tof

La detección de organismos microscópicos fundamentada en la espectrometría de masas, denominada matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) es una herramienta que tiene

presencia por más de 30 años, esta técnica es confiable, específica y rápida en la identificación de bacterias, micobacterias y hongos, basado en el análisis del perfil de proteínas, en especial ribosómicas, por medio de la generación de una masa que es propio de cada especie.

Cada microorganismo patógeno revelará ciertas características, permitiendo crear una base de datos recogidos de cada masa, por ende, dichos hallazgos obtenidos del microorganismo específico puede contrastar automáticamente con la base de datos y los resultados emitidos nos darán un valor de referencia. La técnica es una gran ayuda para el laboratorio microbiológico la cual proporciona la tipificación rápida de bacterias y levaduras que se obtienen a partir de colonias aisladas e inclusive a nivel de subespecies (Relloso et al, 2015).

2.10 Medios de cultivo

El medio de cultivo elegido estará en función de algunas variables , entre ellas: la especie a ser sembrada, la técnica de cultivo, la edad y el tipo de explante, debido a que la composición del ambiente incide en el desarrollo y morfogénesis de los tejidos de la planta. La mayoría de los medios de cultivo están conformados por: nutrientes inorgánicos, reguladores de crecimiento, fuente de carbonos, vitaminas, agentes gelatinizadores, suplementos no definidos y 95% de agua (Roca y Mroginski, 1991).

2.10.1 Factores que inciden en el crecimiento in vitro

Para que los cultivos in vitro se desarrollen adecuadamente, las condiciones del medio son relevantes para su mantenimiento; por ende, se debe acoplar a los cultivos a imitaciones superficiales de condiciones naturales. Los factores preponderantes son: la luz, la humedad y la temperatura (Borges et al., 2009).

- **Luz:** es un elemento importante para que la fotomorfogénesis tenga lugar y los brotes se desarrollen con un aspecto normal, también brinda apoyo a la fotosíntesis. Por lo común, favorece la estimulación de la germinación por

medio de la exposición a la luz roja, en esta parte del procedimiento se encuentra incluido el fitocromo, el cual contribuye en el crecimiento idóneo del embrión (Pérez, 2013).

- **Temperatura:** cuando se aplica la iluminación, la temperatura debe hallarse entre 22°C a 25°C; mientras que, la parte interna de los frascos de cultivo oscila entre 1°C a 2°C más de la temperatura ambiente, a causa del efecto invernadero, dando como resultado un termoperiodo leve, el mismo que se halla inverso a la temperatura invariable de la cámara de cultivo (Marassi, 2013).
- **Humedad:** este proceso demanda una humedad elevada, para que se activen varios componentes metabólicos claves para una evolución en el procedimiento de germinación; pese a que, internamente es absolutamente hermético, este escenario que se crea es para construir las condiciones que soporten un intercambio gaseoso y un ambiente conveniente (Piñuela, 2001).

2.10.2 Problemas asociados al cultivo in vitro

- **Contaminación.**

La presencia de patógenos en el cultivo in vitro merma la confiabilidad de los resultados, durante la fase de adaptación, esto a causa del ambiente físico del cultivo el cual proporciona un hábitat apto para el crecimiento de las mismas (López, 2013).

La concurrencia de microorganismos perjudiciales en la primera etapa se origina cuando la planta se desarrolla a nivel del campo y se halla expuesta a enfermedades y a agentes contaminantes con una baja intervención de algún monitoreo ambiental (Ramírez y Salazar, 1997).

Los tejidos vegetales in vitro se ven mayormente afectados con la presencia de microorganismos superficiales y sistémicos (hongos y bacterias) de la planta

progenitora. En algunos casos este tipo de patógenos no se pueden identificar fácilmente por lo que se alojan hasta que puedan evolucionar cuando las condiciones son favorables para reproducirse y causar el daño a los tejidos. Por ejemplo, la transferencia de los explantes a un medio nuevo, se debe de realizar cuando haya una disminución de sales minerales y sacarosa en dicho medio (López, 2013).

- **Oxidación.**

Cuando los tejidos vegetales son cultivados in vitro y tienden a oscurecerse dicho proceso se denomina degradación el mismo que es provocado por la presencia de radicales libres de diferentes componentes celulares; por ejemplo, la oxidación de los elementos fenólicos son catalizados por la presencia de la enzima polifenol oxidasa con el fin de generar quinonas, en el caso de los explantes la tonalidad es marrón o negro unos instantes después del aislamiento, impidiendo el crecimiento, ocasionando daño y finalmente la muerte del tejido, para los tejidos maduros tienen mayor probabilidad de sufrir este tipo de oxidación que los jóvenes (Azofeifa, 2008).

Frecuentemente, los procesos de oxidación son producidos por la reacción abrasiva del agente desinfectante empleado mientras se aplicaban protocolos de asepsia. El impacto se puede reducir al disminuir el tiempo del procedimiento de esterilización del explante o eligiendo un agente desinfectante acorde al explante (Azofeifa, 2008).

La estimulación de los componentes fenólicos son originados cuando las plantas se encuentran en situación de estrés o por perjuicios mecánicos producto del aislamiento de los explantes de la planta donadora, el color oscuro es causado por la acción de las enzimas oxidasas (exudadas y sintetizadas por tejidos lastimados) (López, 2013).

Los reguladores de crecimiento adicionados al medio de cultivo inciden en la producción de polifenoles; sin embargo, la tonalidad oscura de los explantes no es

firme, debido a que un mismo regulador que influye en la oxidación no presenta un efecto idéntico en otras especies. Las auxinas (el ácido 2,4-diclorofenoxiacético) y las citoquininas (6-bencilaminopurina) exponen altos índices de relación con el oscurecimiento de los explantes. Las sustancias fenólicas poseen un efecto autocatilítico cuando son expelidas por el implante; por lo cual, se considera como un método eficaz de control por la realización de subcultivos frecuentes colocados en un medio de cultivo fresco durante un periodo de corto tiempo (López, 2013).

- **Vitrificación.**

Se la conoce como transformación hiperhídrica, traslucidez, glucosidad, hiperhidricidad y vitrosidad. Esta hace referencia a una desorganización fisiológica que se manifiesta en algunas especies de plantas que se caracteriza por el crecimiento de tejidos vítreos, hiperhidratados, suculentos y translúcidos, debido al medio inadecuado del cultivo y la compleja supervivencia al trasplante. Este problema se identifica por exponer una gran cantidad de agua en los tejidos, afectando al proceso normal de la fotosíntesis y al intercambio gaseoso (López, 2013).

El desorden fisiológico se producen por la formación y estabilidad del medio de cultivo; en otros términos, una escasa concentración en agar; particularmente, en cultivos a base de medio líquido, ocasionando por un exceso de: humedad, por componentes nutricionales, elevados niveles de hormonas de crecimiento y baja energía luminosa. Las variables críticas de la vitrificación son: la humedad relativa y el potencial hídrico dentro del medio de cultivo (López, 2013).

De acuerdo con Toro 2004, las acciones empleadas para reducir los problemas de vitrificación son:

- Aumento de la concentración de agar en el medio de cultivo.
- Regulación de los niveles de citoquinina.
- Incremento de la intensidad luminosa (López, 2013).

2.10.3 Cuidado en el manejo in vitro

Los cultivos de tejidos in vitro están expuestos a varios factores que pueden impactar en su evolución, la contaminación por bacterias y hongos provienen del medio de cultivo en el que se siembra, ya que es un medio adecuado para el desarrollo y propagación para los microorganismos patógenos, desencadenando en una alta probabilidad de mortandad de tejidos, y así reduciendo los indicadores de propagación y enraizamiento del explante (Rossetti, 2014).

Los microorganismos ambientales, pueden llegar a cubrir toda la superficie del medio de cultivo, colonizándolo y provocando el medio de cultivo causando clorosis y necrosis del tejido y a la postre la muerte de las plantas; por esta razón, es recomendable trabajar con medios de cultivos y explantes esterilizados con protocolos adecuados de asepsia y con ambientes apropiados. Por ejemplo, se pueden eliminar los microorganismos a una temperatura de 121°C de 15 a 20 minutos (Rossetti, 2014).

Para evitar esto es necesario laborar en ambientes apropiados; esterilizando los medios de cultivos en autoclave con una presión de 15 lb. durante 15 a 20 minutos ya que a esta presión la temperatura del vapor llega a 121°C, lo suficiente como para matar a todas las formas de vida, además es necesario un adecuado manejo de asepsia para la desinfección de los explantes permitiendo liberarlos de bacterias y hongos exógenos y la realización de los medios de cultivos con seguras normas de asepsia (Vargas, 2012).

2.11 El explante

El procedimiento consiste en elegir una fragmento de tejido ya se de una hoja, tallo, raíz, yemas, anteras, etc. que se extrae de la planta madre con propósitos de propagación. La selección del explante adecuado comprende el paso inicial para el inicio del cultivo. Esta técnica de reproducción obliga a la planta a cumplir con los requerimientos aptos para ser parte del proceso (Villalobos y Thorpe, 1991).

El explante debe tener un apropiado desempeño ante las condiciones in vitro. Por ello, es relevante tomar en consideración que al momento de aislar una parte

de tejido u órgano de la planta, éste ocasiona una condición de estrés que modifica el metabolismo celular afectando principalmente al balance hormonal. Se considera que un explante es adecuado cuando sus células presentan altos porcentajes de supervivencia y teniendo pocas probabilidades a descomponerse y siendo eficientes en los medios in vitro (Villalobos y Thorpe, 1991).

Aspectos que se deben considerar para la propagación in vitro de un explante:

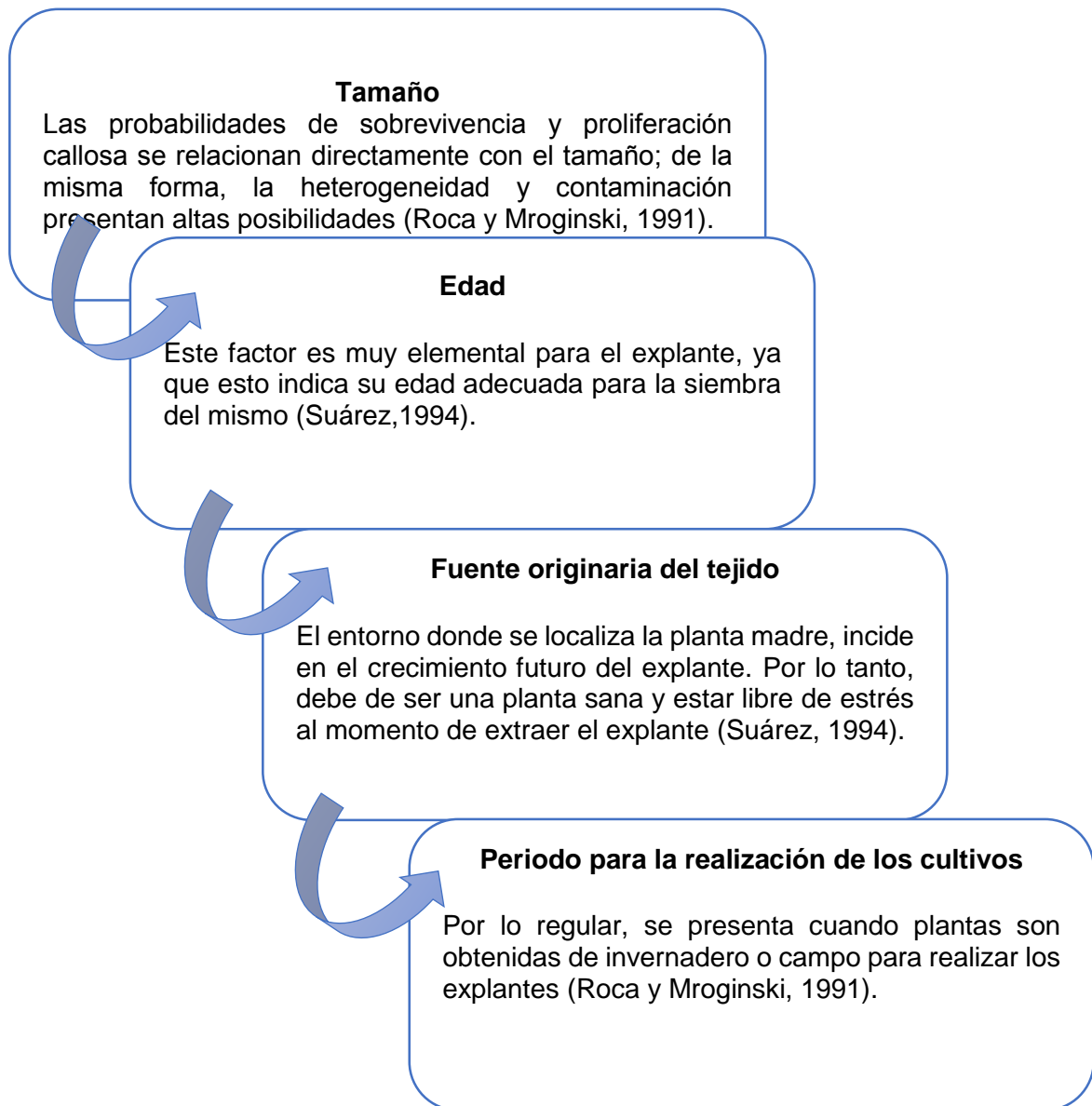


Gráfico 2. Realizada por el autor en la cual describe los aspectos a considerar para la propagación in vitro

2.12 Requerimientos nutricionales para los brotes de callos de las vitroplántulas

2.12.1 Elementos minerales inorgánicos

El crecimiento de una planta in vitro necesita de macro y micro nutrientes mezclados. La concentración dependerá de la especie, donde los elementos solicitados para macronutrientes son concentraciones mayores que 0,5mmol.L-1 y para micronutrientes concentraciones menores que 0,05mmol L-1. Los macronutrientes incluyen algunos elementos como: fósforo, potasio, nitrógeno, azufre, calcio y magnesio; como sales en el medio y son esenciales para el desarrollo de la planta (Razdan, 2003).

El nitrógeno como fuente se encuentra complementada por los iones nitrato y los iones amonio. Asimismo, es primordial al ser una molécula de proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, clorofila y hormonas de plantas. Es un fuerte influyente en el enraizamiento de brotes in vitro. Los macronutrientes presentan algunas funciones como el fosforo, el cual se sitúa en los tejidos de acelerado desarrollo en las plantas, es necesario para la fotosíntesis y respiración. El potasio tiene un papel relevante en la homeostasis celular, asiste en la síntesis de carbohidratos y proteínas, interviene en la fragmentación celular e impulsa el crecimiento meristemático. Del mismo modo, el calcio es un elemento de la pared celular y favorece la formación de pectina; mientras que, el magnesio es el componente principal de la clorofila y funciona como una enzima activadora; y el azufre forma parte de algunas proteínas y ayuda en el crecimiento de la raíz (Sathyanarayana y Varghese, 2007).

Los microelementos como el boro, manganeso, cobalto, zinc, cloro, molibdeno, iodo, hierro y cobre son necesarios en proporciones pequeñas para el desarrollo de las células y tejidos de la planta. El hierro constituye uno de los

micronutrientes indispensables para la síntesis de clorofila, respiración y en las conversiones de energía en la fotosíntesis (Abdelnour y Escalant, 1994).

2.12.2 Elementos orgánicos

- **Fuentes de carbono.**

El azúcar es considerada como una fuente principal de carbono y energía más utilizada, esta es importante para el desarrollo y crecimiento del cultivo, a causa de que gran parte de cultivos in vitro no pueden realizar el proceso de fotosíntesis de forma eficiente, debido a la insuficiente estructuración celular y desarrollo de tejidos, restringido intercambio gaseoso e inadecuadas condiciones medioambientales (Bhojwani y Razdan,1996). La glucosa, maltosa, fructuosa y galactosa son otros tipos de azúcar que funcionan como fuente de carbono (Roca y Mroginski,1991).

- **Vitaminas, aminoácidos y suplementos no definidos.**

El crecimiento y la morfogénesis en plantas in vitro, pueden crecer óptimamente si se le adicionan cantidades exactas de nutrientes orgánicos, tales como: vitaminas, suplementos no definidos y aminoácidos. Sin embargo, las proporciones dependen del genotipo y la especie (George et al., 2008).

Las vitaminas forman parte de las enzimas que intervienen en las funciones metabólicas. El ácido nicotínico, el mioinositol, la piridoxina y la tiamina son las vitaminas más comunes aplicadas en los medios de cultivo, pero la tiamina es esencial, debido a que es parte del metabolismo de los carbohidratos y la biosíntesis de algunos aminoácidos (George et al., 2008).

Dentro de los suplementos no definidos se encuentra el agua de coco, el jugo de uva, la caseína hidrolizada, el jugo de naranja, etc, estos compuestos causan varias reacciones en los cultivos. Son ricos en nitrógeno, carbohidratos, vitaminas, ácidos grasos, reguladores de crecimiento, en distintas concentraciones (George et al., 2008).

2.12.3 Reguladores de crecimiento

La función principal se basa en generar una acción de genes, desarrollo y crecimiento en las plantas, los niveles de concentraciones son mínimos. Entre los modificadores de crecimiento se hallan: auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno y ácido ábscisico (Trigiano y Gray, 2005). Las moléculas más empleadas para regular el crecimiento y la morfogénesis son las auxinas y citoquininas (George et al., 2008).

- **Auxinas.**

Las auxinas al ser reguladores de crecimiento de bajo peso molecular, ayudan en la dominancia apical, embriogénesis somática y formación de raíces adventicias, pero se encargan especialmente de la elongación celular, todas en concentraciones mínimas. Por lo regular, en concentraciones altas se puede formar el callo. Las auxinas naturales son: el ácido indolacético (AIA) y ácido indolbutírico (IBA); mientras que las sintéticas están integradas por el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido dicloro fenoxiacético (2,4-D). Para el enraizamiento se utilizan IBA, AIA y ANA, cuando interactúan con una citoquinina se produce la proliferación de brotes. El 2,4-D se usa frecuentemente para la inducción y generación de callos. Empero, el AIA es la auxina menos estable, pero no es tan efectiva como el ANA y 2,4-D. Otro mecanismo para promover el crecimiento de callos y de células en suspensión es la combinación de auxinas con citoquininas (Trigiano y Gray, 2005).

El AIA al ser una molécula orgánica natural, tiene como posible precursor el triptófano. Esta auxina se sintetiza en los tejidos de rápido crecimiento y división (meristemas apicales, frutos en desarrollo, hojas jóvenes y semillas) (Taiz y Zeiger, 2006).

- **Citoquininas.**

Las citoquininas promueven la división celular y el desarrollo de brotes in vitro, interviniendo en el desarrollo de los callos que provocan el crecimiento de yemas axilares que estimulan la diferenciación de brotes adventicios de callos y órganos, inhiben la formación de raíz, impiden la elongación de los brotes y modifican la dominancia apical. Conforme a la concentración se exponen los efectos. Por ejemplo, cuando la concentración es alta, se activa el desarrollo de

brotos adventicios y también se imposibilita la creación de las raíces (Trigiano y Gray, 2005). Regularmente, las citoquininas más usadas son: zeatina, benciladenina, kinetina, 2 isopenteniladenina y tidiazuron; sin embargo, la primera citoquinina aislada fue la kinetina (Sathyanarayana y Varghese, 2007).

2.12.4 Agentes gelatinizadores

Conforme a Roca y Mroginski (1991) el porcentaje de efectividad de un cultivo está en función del tipo y la concentración del agente gelatinizador. La función se centra en favorecer el contacto del explante con el medio semisólido (superficie o incrustado). Durante muchos años, el agar se ha usado para estos fines con un grado de concentración de 0,5% a 1,0% (w/v). En un ambiente muy blando la respuesta del cultivo a la concentración empleada puede ocasionar hiperhidricidad y en el otro extremo (medio sumamente sólido) el crecimiento se atrofia.

El agar es considerado un polisacárido, el cual está integrado por agarosa y agarpectina. Al ser un componente no reactivo a los elementos del medio y al no estar direccionado por enzimas de tejidos vegetales, es ideal como un agente gelatinizador (Trigiano & Gray, 2005). No obstante, existen otros tipos de agente gelificantes alternativos como: transfergel, agargel, agarosa, phytigel, y gelrite.

2.12.5 Potencial de hidrógeno.

El potencial de hidrógeno (pH) del medio de cultivo es importante. Los valores que maneja para adaptarse al medio oscilan entre un pH entre 5,3 y 5,8. Cuando se presentan valores superiores o inferiores al rango de pH de 4,5 a 7,0; los explantes se ven afectados en su crecimiento al ser limitado, porque impactan variables como la inestabilidad de reguladores de crecimiento, la precipitación de sales e iones y cambios producidos en la consistencia del agar (Trigiano & Gray, 2005).

2.12.6 Elaboración de los medios para el cultivo.

Hoy en día, los productos para la elaboración de los medios de cultivos en su gran mayoría se mercantilizan, se encuentran comúnmente como liofilizados,

este tipo requieren rehidratación. Cuando se hace más eficiente el proceso, la preparación de dichos cultivos se simplifica debido a una gran presencia de los mismos en el mercado y se debe diluirla en agua destilada de acuerdo a las directrices del fabricante.

Por lo regular, las sustancias termolábiles son esterilizadas mediante filtración y se juntan con los otros elementos luego que se hayan esterilizados en el autoclave y enfriados a temperatura ambiente. Si se trata de medios de agar es recomendable manejar temperaturas de 40 ° C a 50 ° C. Antes de realizar dicho procedimiento los medios líquidos son distribuidos en recipientes como tubos, matraces, etc. Cuando el medio es sólido se debe expender en los recipientes antes mencionados; por ende, se requiere fundir el agar utilizando técnicas como baño María o a través de un horno microondas. A continuación, dichos medios son colocados en los tubos o matraces (no se emplean placas Petri), después se cubren y se esterilizan en el autoclave (Sánchez, 2014).

Cuando se ha llevado a cabo la esterilización, los medios se dejarán enfriar a temperatura ambiente, mientras que los medios sólidos se contendrán en tubos, en algunos casos se deben inclinar para que al solidificarse adopten la forma de agar inclinado si es este el objetivo (Sánchez, 2014).

El medio derretido y estéril es colocado en las placas Petris utilizando un ambiente esterilizado (cerca del mechero de Bunsen) siendo oportuno la homogeneidad del medio de cultivo durante la manipulación con el fin de prevenir que el agar se precipite al fondo del recipiente y evitar que se divida uniformemente en todas las placas. Asimismo, es probable mantener el medio asignado al preparar las placas Petri solidificado con todos los protocolos de esterilización, donde se fundirán los tubos en baño María al instante de organizar dichas placas. Los medios sólidos y líquidos son esterilizados y conservados con una temperatura adecuada para minimizar el secado y el cambio en la concentración de sus elementos; por lo tanto, es necesario mantenerlos a 4°C (Sánchez, 2014).

2.12.7 Agar, Murashige y Skoog, kinetina

- **Agar.**

El objetivo de este medio de cultivo no selectivo es aislar y recontar los microorganismos con deficientes requerimientos nutricionales, además este medio de cultivo es mayormente utilizado en laboratorios de salud pública. Los elementos como: la pluripeptona y la carne son una fuente de carbono, nitrógeno y adicionan nutrimentos para el crecimiento bacteriano. Por otro lado, el cloruro de sodio en el agar desempeña el papel de agente solidificante. Los suplementos adecuados son sangre ovina desfibrinada estéril, la cual beneficia el crecimiento de microorganismos exigentes en sus necesidades nutricionales y proporciona una visualización limpia de las reacciones de hemólisis (Britania, 2015).

- **Murashige y Skoog.**

Para la micropropagación se usan los medios Murashige y Skoog, los requerimientos nutricionales que comprenden son elementales parte las plantas. Se desenvuelven como macronutrientes, sales inorgánicas, micronutrientes, vitaminas, carbohidratos, y aminoácidos (Rodríguez et al., 2004). Este medio contiene una mayor concentración de sales debido a las altas concentraciones de iones amonio, iones cloro e iones nitrato que contiene concentraciones de Ca (3.0 mM), PO₄⁻(1.3 mM), Mg⁺ (1.5 mM) y Cu⁺⁺ (0.1 mM) que relativamente bajas comparado con otros medios de cultivo (Arana et al., 2015).

- **Kinetina.**

Es considerada un regulador de crecimiento o fitohormona de citoquinina de tipo adenina, empleado en el cultivo de tejidos vegetales; por lo general, se utilizan medios de cultivo (Murashige y Skoog) en conjunto con las auxinas, las principales acciones se centran en la estimulación de la germinación de semillas de diferentes especies forestales, fomenta la división celular, incita la formación de callos y regenera los tejidos de brotes a raíz de los callos; asimismo, dilata las particularidades de envejecimiento, como la celeridad de crecimiento celular y tamaño (Cueva y Lucero, 2018).

2.12.8 Esterilización de explantes

- **Asepsia de los explante.**

Los tejidos responsables del crecimiento (tejido meristemático) obtenido para el cultivo in vitro se habrá que desinfectar y monitorear el crecimiento microbiano. La técnica de esterilización se detalla a continuación:

1. Para conseguir la condiciones adecuadas de esterilización, los explantes extraídos de la planta madre son lavados con detergente comercial al 40% (con un 5% de hipoclorito de sodio activo NaClO) durante media hora, luego realizándose tres enjuagues con agua destilada estéril.
2. Después los explantes son organizados de acuerdo al tamaño o secciones pequeñas, medidas menores de 0.8 cm³.
3. Existen casos, donde los explantes presentan complicaciones al desinfectarlos, por lo que sumergirían en jabón al 2% antes de ser enjuagados con agua estéril; posteriormenete, se colocan los explantes en los medios de cultivo.
4. Por último, la cantidad de explantes extraídos estará en función de la planta madre (Kancab, 2016).

- **Agentes desinfectantes.**

La variedad de agentes desinfectantes permiten esterilizar las superficies de los explantes, las cuales suelen alojar contaminantes microbiológicos; por este motivo, se deben implementar procedimientos que esterilicen integralmente los tejidos antes de ser plantados en el medio nutritivo (Bhojwani y Razdan, 1996).

Tabla 4. Tipos de agentes desinfectantes más utilizados

Agente	Descripción
Alcohol etílico	La naturaleza de los explantes es relevante para proceder a la esterilización superficial mediante la sumersión en alcohol etílico (etanol) al 70% (v/v) de 20 a 60 segundos, en conjunto con las demás sustancias desinfectantes.

Hipoclorito cálcico	El hipoclorito cálcico se utiliza entre 5 a 30 minutos con concentraciones de 1% y 6% (p/v), sometidas a la naturaleza del material a desinfectar. De la misma forma, el $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ se introduce con lentitud en los tejidos y presenta menor grado de toxicidad que el hipoclorito sódico.
Hipoclorito sódico	El hipoclorito sódico se lo conoce como lejía comercial, disuelta a una concentración entre 5% y 25% (v/v), el tratamiento con NaOCl se administra entre 5 a 30 minutos, seguido de 20 minutos de varios enjuagues con agua destilada estéril, porque algunas plantas son muy sensibles a este agente.
Peróxido de hidrógeno	El antioxidante más común es el peróxido de hidrógeno, se utiliza es un antioxidante de 1 a 30 minutos en concentraciones de 3% a 10% (v/v); sin embargo, la interacción entre H_2O_2 y NaOCl es tóxica para los tejidos, por lo que se debe considerar enjuagar cuidadosamente los explantes después de cada procedimiento.
Cloruro de mercurio	El cloruro de mercurio se adiciona en concentraciones de 0.1% a 1.0% (p/v) durante 2 a 10 minutos. Es muy efectivo para la esterilización superficial.

Fuente: (Bhojwani y Razdan, 1996).

Los antibióticos que se emplean frecuentemente para la eliminación de patógenos son la gentamicina y la ampicilina en soluciones entre 50 y 100 mg/l durante 30 minutos; no obstante, pueden impulsar su efecto luego de usar alcohol o cloro para la desinfección. Cuando se agrega el detergente sorbitán polioxietileno monolaurato a los agentes desinfectantes contribuye en la eficacia de esterilización, terminando con la tensión superficial entre el agua y el explante (Torres, 2012).

2.12.9 Siembra de explantes en los medios de cultivo

1. Se manipula el brote con una pinza y es colocada sobre una hoja de papel estéril, con el fin de excluir las zonas dañadas del brote, debido a la asepsia. Se pretende alcanzar que el explante tenga un tamaño de al menos 0.5 cm.

2. Luego la yema auxiliar es colocada en el tubo de ensayo, el cual va a contener Murashige y Skoog, estos suplementados con 1.0 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de AIB.
3. Después el tubo de ensayo es cubierto y sellado para ubicarlo en una gradilla y colocada en la repisa de la estancia de crecimiento.
4. Una vez ejecutados los pasos anteriores, se deja la gradilla con los tubos de ensayos en la oscuridad durante 7 días, tapados con una caja.
5. Finalmente, se expone a una luz artificial durante 16 horas luz y 8 de oscuridad a una temperatura de 28° C (López, 2013).

CAPÍTULO III

3 Metodología

3.1 Ubicación y descripción del área de estudio

Esta investigación se la realizó en el Laboratorio de Fitopatología del centro de investigación CIITT de la universidad Católica de Cuenca en la Facultad de Ciencias Agropecuarias. La zona del estudio se encuentra ubicada en la provincia del Azuay, cantón Cuenca, parroquia Machángara. El estudio se desarrolló bajo la dirección y supervisión de la Dra. Nathalie Campos tutora del proyecto.



Imagen 1. Mapa de ubicación geográfica Laboratorio de Fitopatología de Universidad Católica de Cuenca en la Facultad de Ciencias Agropecuarias

3.2 Material biológico

Para efectuar el presente trabajo con un enfoque experimental se usó material biológico; es decir, plantas de *Agave americana* variedad bicolor con 6 años de edad aproximadamente. La altura fue de 2 m, las cuales se recolectaron en

Challuabamba, localizado en el cantón Cuenca, provincia del Azuay. Las plantas seleccionadas cumplieron con todos los requerimientos para elegir el explante adecuado (ver imagen 12).

3.2.1 Esquema general del proceso

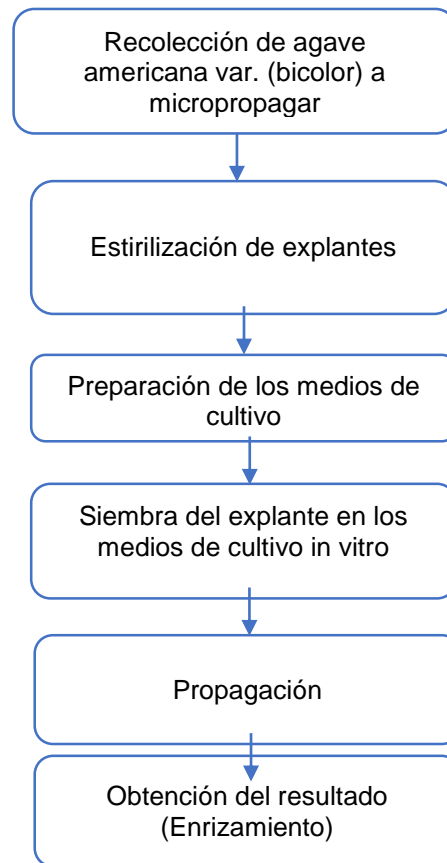


Gráfico 3. Realizada por el autor en la cual describe el esquema del proceso

Fuente: Elaboración propia

3.3 Etapa I: Establecimiento in vitro

Los materiales que integraron el estudio fueron: un frasco de vidrio con la medida de 5,5 cm de diámetro por 6,7 cm de alto y un tipo de ex plante de agave americana var. bicolor. Se realizaron 10 observaciones por cada tratamiento de desinfección. Las variables que se analizaron en esta etapa fueron:

- Explantes vivos: esta variable evalúa a través de la inspección los explantes que exhibieron presencia de tejido sano y aquellos que manifestaron tejidos necrosados o muerte del explante. Se evaluó a los 7 y 15 días de siembra.
- Explantes contaminados: por medio de esta variable se establece cuántos tejidos presentaron contaminación microbiana y el número de tejidos que no mostraron estos organismos. Se evaluó a los 7 y 15 días de siembra.

3.3.1 Preparación del medio de cultivo.

Se sometieron los explantes a una cuarentena para controlar si se infectaban o no; por lo que, para la elaboración del medio de cultivo se utilizó el Murashige y Skoog (MS) al 50% y agar agar en una dosis en general. Después, para la preparación final en las hormonas se utilizó Murashige y Skoog al 100% para simplificar y el agar agar en un valor acorde a los requerimientos (ver imagen 3). A continuación se indican las soluciones utilizadas:

Tabla 5. Medios y soluciones

	Medios y soluciones	Concentración	Medida
Cuarentena	Murashige y Skoog	50%	2,2 g/l
	Agar Agar		9 g/l
Final	Murashige y Skoog	100%	4,4 g/l
	Agar Agar		12,0 g/l
	HCl		80 ul
	NaOH		70-80 ul

Fuente: Elaboración propia

Se procedió a medir el pH= 5,7 y este al ser muy ácido se agregó 12,0 g/l de agar-agar como gelificante. Después este medio de cultivo fue sometido a ebullición para diluir el agar. Del mismo modo, se colocó ácido clorhídrico e hidróxido de sodio a los medios hormonales para luego ser colocado en frascos de vidrio. Se debe recalcar que durante el proceso de cuarentena, se probaron como explantes a las

raíces, pero no se obtuvo una buena respuesta; en cambio, las yemas axilares reaccionaron adecuadamente.

3.3.2 Organización del material vegetal

Los explantes fueron obtenidos de los pencos que fueron trasladados desde el campo al laboratorio. Por lo tanto, se retiró el material contaminado y dañado; además se separaron las hojas y las raíces y manteniendo únicamente la parte principal del Agave para extraer las yemas auxilares con una porción de tejido de aproximadamente 0,7 a 1,0 cm (ver imagen 1 y 4).

3.3.3 Desinfección del explante

El material vegetal proveniente del lugar de colecta reveló un alto grado de contaminación, procediéndose a lavar diligentemente los explantes con la ayuda de una esponja, agua y cepillo con el objetivo de quitar toda la tierra (ver imagen 2 y 5). La metodología de esterilización se resume en la siguiente tabla:

Tabla 6. Tratamientos para la desinfección in vitro de explantes

Tratamiento	Descripción
T	Los explantes resultantes se sumergieron con tween al 20% por 10 min con agitación constante y se enjuagaron cuidadosamente con agua tipo II. Para la desinfección se introdujeron en alcohol al 70% por 1 min y en cloro al 20% durante 10 min. Se efectuaron tres enjuagues consecutivos en agua estéril por 3 min cada enjuague realizándose dentro de la cámara de flujo laminar y finalmente pasaban al proceso de siembra en el medio de cultivo.

Fuente: Elaboración propia

Se debe considerar que 3 de 4 tratamientos sufrieron quemaduras durante el proceso de esterilización; principalmente 1 ana + 3 kinetina (oscuridad).

3.4 Etapa II: Propagación in vitro

Se trabajó en un laboratorio con todos los protocolos de asepsia, una vez efectuada la desinfección se procedió a colocar cada explante en un envase con agua para prever la deshidratación. Posteriormente se las ubicó en cajas de Petri esterilizadas para excluir los tejidos lesionados provocados por la desinfección realizada obteniéndose un explante de aproximadamente 0,5 cm.

Los explantes introducidos in vitro con la dosis de hormonas respectiva se incubaron a 18,5°C con una desviación estándar de 2°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Los explantes permanecieron en incubación durante 21 días.

En esta fase se probaron la eficiencia de las técnicas de micropropagación in vitro del penco, técnicas que están relacionando a los diferentes medios de cultivo que se señalan a continuación. Se aplicó un método experimental con un diseño aleatorio por cada unidad experimental. Se llevaron a efecto 4 repeticiones; por ende, el experimento demandó 110 frascos.

Tabla 7. Tratamiento de propagación

Tratamiento	Descripción
T1	ANA1 + KINETINA3 + BROTE TERMINAL + LUZ
T2	ANA1 + KINETINA3 + BROTE TERMINAL + OSCURIDAD
T3	ANA0,5 + KINETINA3 + BROTE TERMINAL + LUZ
T4	ANA0,5 + KINETINA3 + BROTE TERMINAL + OSCURIDAD
T5	ANA1 + KINETINA1 + BROTE TERMINAL + LUZ
T6	ANA 1 + KINETINA1 + BROTE TERMINAL + OSCURIDAD
T7	ANA0,5 + KINETINA1 + BROTE TERMINAL + LUZ
T8	ANA0,5 + KINETINA1 + BROTE TERMINAL + OSCURIDAD
T9	MURASHIGE Y SKOOG+ LUZ
T10	MURASHIGE Y SKOOG+ OSCURIDAD

Fuente: Elaboración propia

Las variables que se analizaron en la etapa de propagación se definen a continuación:

- Explantes con brotes por tratamiento: la variable permite evaluar y registrar los explantes que mostraron brotes por cada tratamiento a las 4 semanas de cultivo y aquellos que no presentaron.
- Número de brotes por explante: es determinado por el número de brotes proporcionados por explante a las 5 semanas de cultivo.

3.5 Etapa III: Enraizamiento

Se usó un método aleatorio, con 4 observaciones por tratamiento. Los medios de cultivo que se emplearon fueron: Murashige y Skoog 4,4 g/l, suplementado con 4 mg/l de Ácido naftalenacetico (ANA) y 3 mg/l Kinetina y 12 g/l de agar para su solidificación. Las variables analizadas en la fase de enraizamiento se detallan a continuación:

- Plántulas con emisión de raíces: esta variable define el número de plántulas que desarrollaron raíces a los 21 y 30 días de haber sido sembrado el brote en medio enraizante.

CAPÍTULO IV

4 Resultados

4.1 Etapa I: Establecimiento in vitro

Durante la etapa de establecimiento se evaluó un protocolo de desinfección, donde los pencos recibieron un pre-tratamiento que incluyó el lavado del material vegetal con una esponja, agua y jabón; seguido del proceso de esterilización a causa de una elevada contaminación inicial evidenciada. Para la desinfección se introdujeron los explantes en cloro al 20% durante 10 minutos, siendo la concentración óptima; sin embargo, si se excedían de estos lineamientos el tejido empezaba a dañarse presentando bordes blanquecinos de células dañadas por el cloro. La desinfección del material vegetal a emplearse en la propagación es elemental, ya que la consecución de los otros procesos depende de este, porque demandan de condiciones controladas y libres de patógenos que pudieran interrumpir los mismos (ver imagen 6).

4.1.1 Explantes contaminados

La contaminación en los explantes fue del 50% al 75%. La variación de los porcentajes se encuentra en función del protocolo utilizado. La contaminación de las yemas auxiliares ocurrió principalmente por la presencia de hongos antagonistas en el material vegetal introducido. Los tratamientos más efectivos fueron los expuestos a la oscuridad; y siendo los expuestos a la luz los más contaminados (ver imagen 9 y 11).

En la figura se observan los porcentajes de contaminación

Explantos contaminados

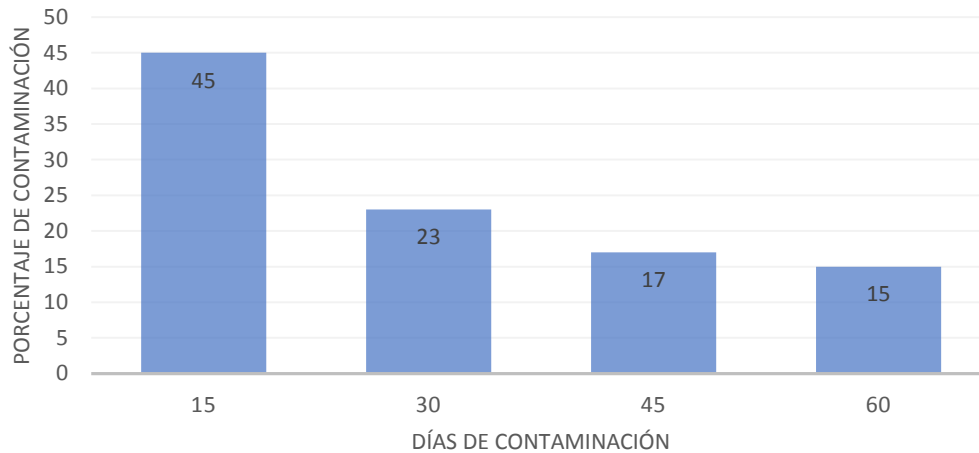


Gráfico 4. Realizada por el autor en la cual describe los explantes contaminados

Fuente: Elaboración propia

4.1.2 Explantes vivos

Las yemas auxiliares se mantuvieron vivas desde el 1 día hasta 40 días después de su siembra, revelando al inicio una pigmentación blanquecina, donde después del trasplante, a los 45 días presentaron una brotación de color verde oscuro. En la tabla se muestra el porcentaje de explantes vivos de *Agave americana* variedad bicolor a los 15 y 60 días de incubación (ver imagen 8).

Explantos vivos

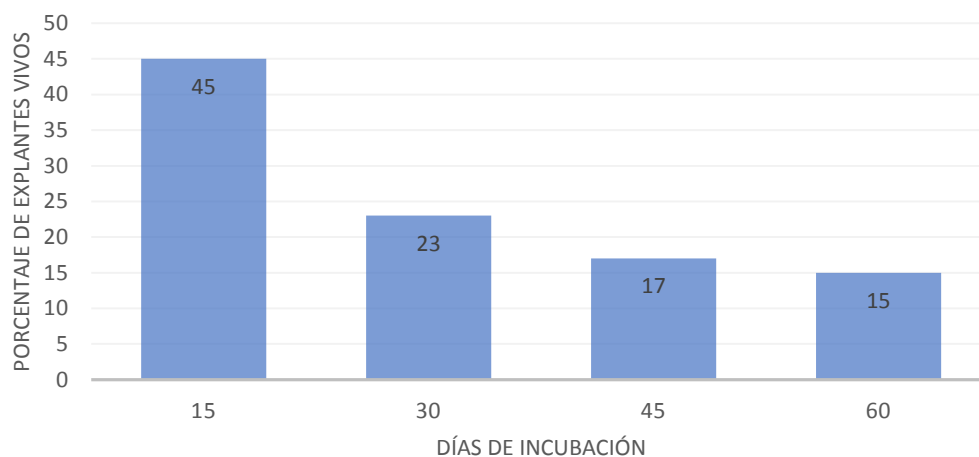


Gráfico 5. Realizada por el autor en la cual describe los explantes vivos

Fuente: Elaboración propia

4.2 Etapa II: Propagación in vitro

En la etapa II, se determinó el mejor protocolo de propagación de agave americana variedad bicolor, a través de la evaluación de las variables: explantes con brotes por tratamiento y el número de brotes por explante.

4.2.1 Explantes con brotes por tratamiento

Los altos porcentajes de explantes con brotes se obtuvieron en los tratamientos 2, 4 y 8 con valores de 50%, 10% y 20%, respectivamente; en tanto que los tratamientos 10 y 1, presentaron 100% y 80% de incidencia de contaminación. Los resultados se muestran en la figura. Por otro lado, los tratamientos 1, 3, 5, 6, 7, 9 y 10 no presentaron explantes con brotes (ver imagen 7).

Tabla 8. Explantes con brotes por tratamiento

Tratamiento	Kinetina	Auxina	Explantes con brotes (%)
T1	3 mg/l KIN	1 mg/l ANA	0
T2	3 mg/l KIN	1 mg/l ANA	50
T3	3 mg/l KIN	0,5 mg/l ANA	0
T4	3 mg/l KIN	0,5 mg/l ANA	10
T5	1 mg/l KIN	1 mg/l ANA	0
T6	1 mg/l KIN	1 mg/l ANA	0
T7	1 mg/l KIN	0,5 mg/l ANA	0
T8	1 mg/l KIN	0,5 mg/l ANA	20
T9			0
T10			0

Fuente: Elaboración propia

4.2.2 Número de brotes por explante

Los resultados se fueron obtenidos por el número de brotes por cada explante cultivado por 4 semanas de siembra en los medios de propagación. En la tabla y la figura se expone el número promedio de brotes por cada tratamiento de

propagación. Los cuales se encuentran en un rango entre 0 a 4 brotes por explante, donde el tratamiento con mayor brotes fue T2; mientras que los tratamientos 1, 3, 5, 6, 7, 9 y 10 no mostraron brotes (ver imagen 10).

Tabla 9. Número de brotes por explante

Tratamiento	Kinetina	Auxina	Brotos promedio por explante
T1	3 mg/l KIN	1mg/l ANA	0
T2	3 mg/l KIN	1 mg/l ANA	4
T3	3 mg/l KIN	0,5 mg/l ANA	0
T4	3 mg/l KIN	0,5 mg/l ANA	1
T5	1 mg/l KIN	1 mg/l ANA	0
T6	1 mg/l KIN	1 mg/l ANA	0
T7	1 mg/l KIN	0,5 mg/l ANA	0
T8	1 mg/l KIN	0,5 mg/l ANA	2
T9		M&S	0
T10			0

Fuente: Elaboración propia

4.3 Etapa III: Enraizamiento

La cantidad de raíces y el tamaño de las mismas, son variables importantes para establecer un medio apto para que se desarrolle la fase de enraizamiento. Esta etapa in vitro facilita la apropiada transferencia de los brotes al suelo. En algunos casos se presentan circunstancias que predisponen a que los explantes no evolucionen de forma correcta. Para el caso actual, no se pudo enraizar, debido a la presencia de hongos endófitos, al ser cortados los explantes, sufren estrés y son más propensos para que sean colonizados por hongos y bacterias. El género *Kosakonia cowanii* y *Fusarium spp.* se identificaron como principales causantes del daño ocasionado a los órganos del cultivo.

4.4 Discusión

Por lo regular en la desinfección de la especie agave se emplea un procedimiento, donde los explantes se lavan y esterilizan con alcohol entre el 70% al 80%, una solución de hipoclorito entre el 1% al 3% por 10 a 15 minutos, con tres

enjuagues, con las debidas condiciones de asepsia en el espacio determinado (cámara de flujo laminar). Luego se procede a sembrar en los medios Murashige y Skoog (MS), suplementado con otros elementos (cinetina, sacarosa, agar, entre otros) (Espino et al., 2012). Según (Mihaljevic et al., 2013) expone que los procedimientos de desinfección más empleados para la micropropagación se efectúan con etanol al 70% e hipoclorito de sodio al 1% y 3%. Asimismo, se utilizaron otros químicos como nitrato de plata, hipoclorito de calcio y bicloruro de mercurio. No obstante, los requerimientos para la esterilización son distintos y se encuentran en función de la clase del tejido y la naturaleza del explante usado para la micropropagación. Para el proceso actual, el tratamiento de desinfección estuvo conformado por tween al 20% por 10 minutos con constante movimiento, seguido por una aplicación con alcohol al 70% por 1 min y en cloro al 20% durante 10 min. Se efectuaron cuatro enjuagues consecutivos en agua esteril por 3 min cada enjuague se realizó dentro de la cámara respectiva. Sin embargo, se debe considerar que existió un bajo porcentaje de agentes contaminantes al inicio del procedimiento; de la misma manera, el empleo de los químicos en un período corto causó lesiones a los tejidos de los explantes, por ende, se eliminó el tejido dañado y sólo se conservó una porción de tejido meristemático. La literatura coincide en gran parte con el método usado para el estudio.

Conforme a Moreno y Monja (2021) la obtención de brotes dependen de varios factores, como la especie o las condiciones presentes al momento de extraer el explante. Para la multiplicación se debe considerar el tamaño, el estado de los brotes y las condiciones deben ser controladas para que al desarrollo.

Del mismo modo, (Rodríguez et al. 1999) expone que la etapa de crecimiento involucra la destrucción del letargo de las yemas auxiliares, favoreciendo la presencia de sustancias como las auxinas y las citoquininas.

En relación a los explantes que no lograron la brotación, pero revelaron hinchamiento con tonalidad verde oscuro, puede ser producto de la manipulación que se les brindo a las yemas. Otra variable podría ser la escases de las plantas madres al ser una especie poco común, las yemas no eran homogéneas en sus condiciones. De acuerdo con Roca y Mroginski (1991), la edad fisiológica, la

procedencia y el tamaño del explante son factores importantes al momento de establecer los cultivos y propagarse de forma exitosa.

La oxidación presente en las yemas axilares, posiblemente fue resultado de la división efectuada a los explantes al retirar las partes dañadas por la desinfección. Según Gómez 2002 menciona que la coloración oscura los brotes se manifiestan debido a la presencia de enzimas oxidativas, siendo segregadas y sintetizadas por los tejidos lesionados. En el mismo contexto, Azofeifa 2008, indica que uno de los causantes de oxidación en los explantes es la influencia de los reguladores de crecimiento, debido a que producen polifenoles en los medios de cultivo, las auxinas y citoquininas son evaluados como reguladores del desarrollo asociados a la presencia de oxidación de las yemas axilares.

Al sembrar cultivos de explantes en un medio in vitro se evidencian algunos inconvenientes debido a la naturaleza propia del explante o la variedad con la que se trabaje. Las principales razones para que los cultivos presenten altos índices de contaminación son vitropatogenos; es decir, agentes hallados en la parte interna y externa de los explantes, y por ende dichos fracasos suelen presentarse en el laboratorio durante el periodo de cultivo, por lo que el pH del tejido se puede ver alterado, desencadenando en la muerte del mismo, además hay una competencia por los nutrientes por lo cual se produce un cambio en el medio de cultivo (Sharry et al., 2015). Del mismo modo, (Hamidoghli et al., 2007) revela que los explantes contaminados, representan un gran problema en el cultivo in vitro. Los resultados obtenidos respecto a los explantes contaminados son acordes a la revisión bibliográfica, ya que el porcentaje osciló entre el 50% al 75%, siendo los más afectados aquellos expuestos a la luz.

La contaminación de los explantes se relacionó directamente con la presencia de hongos endófitos, probablemente adquiridos por la planta madre en su entorno natural, pese al haber realizado el proceso de desinfección. Concorcando con Ramírez et al. (2000) expresa, que los hongos patógenos en el establecimiento in vitro, pueden encontrarse en la superficie como en el interior de las yemas axilares; sin embargo, la dificultad en la desinfección aumenta cuando se localizan en el interior del explante. Como es el caso de Blanco et al. (2004), quien

no eliminó el microorganismo patógeno porque este se situaba internamente en las yemas axilares, esto no significa que la desinfección no aporte, más bien ayuda en un 90% a la desinfección superficial de los explantes.

Los organismos microscópicos no visibles en los explantes, tarde o temprano se revelan en los cultivos, algunos patógenos pueden permanecer latentes o inhibidos por alguna variable presente en el medio de cultivo del vegetal y se propagan cuando los cultivos envejecen o se incuban durante largos períodos de tiempo. Los hongos endófitos en algunas circunstancias no son evidentes hasta después de un largo periodo de tiempo, gran parte de estos microorganismos son perjudiciales para los tejidos de las plantas y para la fase de micropropagación (UNIDO, 2004).

Para el proyecto actual, los microorganismos que obstaculizaron el proceso de propagación fueron *Kosakonia cowanii* y *Fusarium* (spp), debido a que la planta experimentó un desbalance nutricional e incluso estrés hídrico, desencadenando en la invasión del hongo, el ambiente se volvió apropiado para los huéspedes y desfavorable para la planta. El primer género se ha identificado recientemente como patógeno para las plantas, mientras que el segundo es uno de los más comunes en el suelo agrícola.

4.5 Conclusiones

- Las técnicas de propagación tradicionales del agave son poco eficientes debido al tiempo que se requiere para obtener un hijuelo, no obstante, el uso de métodos de cultivo de tejido in vitro se han convertido en una herramienta en cuanto a la propagación de plantas, ya que se realiza bajo condiciones controladas y con resultados positivos respecto a la propagación acelerada en grandes cantidades, en la mayoría de caos libres de patógenos.
- Del estudio realizado utilizando las diferentes técnicas de micropropagación los mejores tratamientos fueron: T2 que corresponde a ANA 1 + KINETINA 3 + Brote terminal + obscuridad, el T4: ANA 0,5 + KINETINA 3 + Brote terminal + obscuridad y el T8: ANA 0,5 + KINETINA 1 + Brote terminal + obscuridad.
- El método de desinfección estuvo conformado por tween al 20% durante 10 minutos con constante movimiento, seguido por una aplicación de alcohol al 70% por 1 min y en cloro al 20% durante 10 min. Se efectuaron cuatro enjuagues consecutivos en agua estéril por 3 min cada enjuague se realizó dentro de la cámara respectiva. El tratamiento sirvió para desinfectar los agentes contaminantes en la parte externa, sin embargo la zona interna del explante no se puede precisar que se haya desinfectado completamente.
- El desarrollo de los brotes no fue el esperado, a causa de las condiciones presentes al momento de extraer el explante, el tamaño y el estado de los mismos, sumado a esto la escases de las plantas madres al ser una especie poco común la variedad bicolor, las yemas no eran homogéneas
- La oxidación presente en las yemas axilares, posiblemente fue resultado de la división efectuada a los explantes al retirar las partes dañadas por la desinfección y por la influencia de los reguladores de crecimiento, ya que generan polifenoles en los medios de cultivo, las auxinas y citoquininas son los más comunes.
- La interrupción del proceso de propagación se debió a la presencia de los hongos endófitos *Kosakonia cowanii* y *Fusarium spp.*, los cuales se

suscitaron probablemente por la planta nutricia en su entorno natural, pese al haber realizado el proceso de desinfección.

- La identificación de hongos endófitos en los cultivos in vitro son protocolos indispensables, no obstante, rara vez se implementan en los laboratorios, debido a que requieren de la incorporación de otros procedimientos e inversión. Cuando existen problemas fitosanitarios reiterativos en los tejidos cultivados in vitro, es necesario contar con este tipo de sistemas que prevean situaciones mayores.

4.6 Recomendaciones

- El material que se emplea como explante deberá estar exento de enfermedades y plagas, con aspecto sano y vigoroso; además deben contar con la misma edad fisiológica, condiciones y procedencia.
- Los protocolos de prevención son relevantes para evitar la propagación de los agentes contaminantes a tiempo, es necesario valorar la relación costo-beneficio para la implementación de los mismos.
- Los procedimientos de desinfección deben abarcar la parte interna y externa de las yemas axilares, para prever futuros episodios de contaminación en los cultivos vegetales, ya que en la mayoría de casos no se evidencian microorganismos patógenos al inicio del proceso.

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Abalos, M., 2001. *Productos forestales no madereros en América Latina. Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura*. [en línea] [consulta: 1 diciembre 2020]. Disponible en: http://www.fao.org/tempref/GI/Reserved/FTP_FaoRlc/old/proyecto/rla133ec/Informes%20Regionales-pdf/Pfnm.pdf
2. Abdelnour Esquivel, A., y Vicent Escalant, J., 1994. *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales* [en línea]. Costa Rica: Turrialba [consulta: 22 enero 2021]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=T9QOAQAIAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
3. Aguilar, B., Enríquez del Valle, J., Rodríguez-Ortiz, G., Granados Sánchez, D., & Martínez Cerero, B. (2014). El estado actual de agave salmiana y a. mapisaga del Valle de México. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 1(2), 106-120-93.
https://www.voaxaca.tecnm.mx/revista/docs/RMAE%20vol%201_2_2014/RMAE-2014-11%20Agave.pdf
4. Allauca Salguero, Rosa Elizabeth, 2011. Diversificación del uso del chaguarmisqui en la gastronomía del cantón Guano, 2010 [en línea]. Tesis de pregrado. Riobamba: Escuela Superior Politécnica del Chimborazo [consulta: 7 diciembre 2020]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2324/1/84T00074.pdf>
5. Almaraz Sánchez, A., Alvarado Rosales, D., Tlapal Bolaños, B., y Espinoza Victoria, D., 2012. Identificación de hongos antagonistas a phytophthora cinnamomi rands en bosques de encino de el arrayanal, colima y tecoanapa, guerrero. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente* [en línea], 18, no. 3, pp. 341-355 [consulta: 1 diciembre 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.09.061>
6. Arana Paredes, M., Rengifo del Águila, S., y Chico Ruiz, J., 2015. Germinación in vitro de dianthus caryophyllus en diferentes medios de cultivo. *Sagasteguiana* [en línea], 3, no. 1, pp. 55-66 [consulta: 11 febrero 2021]. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/REVSAGAS/article/view/2009>
7. Arie, T., 2019. Fusarium diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. *Journal of Pesticide Science* [en línea], 44, no. 4, pp. 275-281 [consulta: 10 enero 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.1584/jpestics.J19-03>
8. Arizaga, S., y Ezcurra, E., 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks.

- Oecologia* [en línea], 101, no.1, pp. 329-334 [consulta: 14 diciembre 2020]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00328819>
9. Azoifeifa, A., 2008. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana* [en línea], 20, no. 1, pp. 153-175 [consulta: 17 enero 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
 10. Bhojwani, S. S., y Razdan, M. K., 1996. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice Volume 5, 1st Edition* [en línea]. [consulta: 22 enero 2021]. ISBN: 9780080539096
Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/plant-tissue-culture-theory-and-practice/bhojwani/978-0-444-81623-8>
 11. Blanco, M., Valverde R., y Gómez L., 2004. Micropropagación de *Dracaena deremensis*. *Agronomía Costarricense* [en línea], 28, no. 1, pp. 7-15 [consulta: 25 febrero 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/436/43628101.pdf>
 12. Borges, M., Estrada Abeal, E., y Pérez Rodríguez, I., 2009. Uso de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo in vitro de *dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología* [en línea], 11, no. 2, pp. 127-135 [consulta: 13 enero 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/776/77613172013.pdf>
 13. Britania, 2015. Nutritivo Agar [en línea]. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_60707641dee11.pdf
 14. Cesaveg, 2015. Manual de plagas y enfermedades del agave [en línea] [consulta: 4 diciembre 2020]. Disponible en: <https://docplayer.es/4374771-Manual-de-plagas-y-enfermedades-del-agave.html>
 15. Chawla., H, S., 2002. *Introduction to Plant Biotechnology* [en línea]. Estados Unidos: Enfield [consulta: 2 diciembre 2020]. ISBN: 1-57808-228-5. Disponible en: <https://books.google.co.in/books?id=RgQLISN8zT8C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false>
 16. Chen, Y., Chen, X., Hu, F., Yang, H., Yue, L., Trigiano, R. N., y Cheng, Z., 2014. Micropropagation of *Agave americana*. *HortScience* [en línea], 49, no. 3, pp. 320-327 [consulta: 1 diciembre 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.3.320>
 17. Cruz, H., Campos, G., Valle, J. E., Rodríguez, G., y Velasco, V., 2019. Desarrollo de plantas micropropagadas de *Agave americana* var. *Oaxacensis* durante su aclimatización en invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* [en línea], 10, no. 7, pp. 1491-1503 [consulta: 15 diciembre 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/337095241_Desarrollo_de_planta

- s_micropropagadas_de_Agave_americana_var_Oaxacensis_durante_su_a
climatizacion_en_invernadero
18. Cueva, J. S., y Lucero, H. P., 2018. Evaluación de los reguladores de crecimiento (Kinetina y Ácido giberélico) para acelerar la germinación de *Gynoxys verrucosa*. *Bionatura* en línea], 3, no. 4 [consulta: 11 febrero 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.21931/RB/2018.03.04.8>
 19. De Avila Ruvalcaba, N. (2019). Documentación para el aprovechamiento del agroecosistema forestal no maderable de la Noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore) [Trabajo de Pregrado, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro].
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/46874/NAYELY%20DE%20AVILA%20RUVALCABA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 20. Domínguez, M., González, M., Rosales, C., Quiñones, C., Delgadillo, S., Mireles, S., y Pérez, E., 2008. El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia* [en línea], 16, no. 41, pp. 53-62 [consulta: 1 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67404109.pdf>
 21. Duque Sánchez, Juan Carlos, 2013. Evaluación de tres métodos de reproducción del penco azul (*Agave americana*), en la parroquia Tocachi, cantón Pedro Moncayo Provincia Pichincha [en línea]. Tesis de pregrado. Quito: Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito [consulta: 12 diciembre 2020]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5068/6/UPS-YT00263.pdf>
 22. Espino, Ángeles., Valencia Botín, Alberto., Virgen Calleros, C., Ramírez Serrano, R., Paredes Gutiérrez, S., y Hurtado de la Peña, S. 2012. Micropropagation of agave (*agave tequilana weber. var. azul*) through axillary buds. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* [en línea], 15, no. 3, pp. 693-698 [consulta: 11 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/1355>
 23. Espinosa Barrera, L. (2015). Generalidades e importancia de los agaves en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., 1(7), 161–164. https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2015/2015-10-22-Espinosa_Barrera-Generalidades_e_importancia_de_los_agaves_en_Mexico.pdf
 24. Fucikovsky, Z., 2004. *Agave tequilana Weber var. Azul y sus principales problemas fitosanitarios*. En: *Avances de la investigación en el agave tequilero*. 1era ed. Guadalajara: Consejo Regulador del Tequila A. C.
 25. García, A., y Galván, R., 2017. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Botanical Sciences* [en línea], 1, no. 56, pp. 7-24

- [consulta: 2 diciembre 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.17129/botsci.1461>
26. García Mendoza, Abisaí., Ordóñez, María, y Briones Salas, Miguel, 2004. *Biodiversidad de Oaxaca* [en línea]. México: México [consulta: 20 diciembre 2020]. ISBN: 970-32-2045-2. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=TQfX0cL3ieQC&pg=PA159&lpg=PA159&dq=Agavaceae.+Biodiversidad+de+Oaxaca+Garc%C3%ADa-Mendoza,+A;+Ordo%C3%ADn%C3%A9z,+M;+Briones,+M&source=bl&ots=6mMVrLp7Qn&sig=ACfU3U1J2Wm9cq5KznV-pkih4kF1HmSn4Q&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiYrsOBp73yAhWPRjABHZpEDlgQ6AF6BAgYEAM#v=onepage&q=Agavaceae.%20Biodiversidad%20de%20Oaxaca%20Garc%C3%ADa-Mendoza%2C%20A%3B%20Ordo%C3%ADn%C3%A9z%2C%20M%3B%20Briones%2C%20M&f=false>
27. George E., Hall, M., y Geert Jan, K., 2008. *Plant propagation by tissue culture 3rd edition Volume 1*. [en línea]. Netherlands: Springer. [consulta: 4 febrero 2021]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/plant-tissue-culture-theory-and-practice/bhojwani/978-0-444-81623-8>
28. Gobierno de México, 2017. *Control Biológico de los Picudos del Agave y Cocotero*. CIATEJ [en línea] [consulta: 4 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/Control-Biologico-de-los-Picudos-del-Agave-y-Cocotero/136>
29. Gómez, A., 2002. Biotecnología aplicada a mejora de pelargonium [en línea]. Tesis de postgrado. Madrid: Universidad complutense de Madrid [consulta: 26 febrero 2021]. Disponible en: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/4440/1/T26001.pdf>
30. Gómez, H., Soberanis Ramírez, W., y Tenorio Cantoral, M., 2013. Manual de producción y uso de hongos antagonistas. Servicio Nacional de Sanidad Agraria SENASA [en línea] [consulta: 19 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/descargasarchivos/2017/09/Manual-de-Producci%C3%B3n-y-Uso-de-Hongos-Antagonistas.pdf>
31. Guerrero, C., Martín Rufian, M., Reina, J. J., y Heredia, A., 2006. Isolation and characterization of a cDNA encoding a membrane bound acyl-CoA binding protein from *Agave americana* L. epidermis. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB* [en línea], 44, no. 1, pp. 85-90 [consulta: 8 diciembre 2020]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.01.002>
32. Guillen Cruz, Raquel, 2003. Biocontrol de *fusarium oxysporum* y promoción de crecimiento por rizobacterias en *agave tequilana* weber var. azul [en línea]. Tesis de pregrado. Jalisco: Universidad de Guadalajara [consulta: 6 diciembre 2020]. Disponible en: <http://biblioteca.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/2333>

33. Hamidoghli, Y., Bohlooli, S., y Hatamzadeh, A., 2007. In vitro propagation of *Alstroemeria* using rhizome explants derived in vitro and in pot plants. *African Journal of Biotechnology* [en línea], 6, no. 18, pp. 2147-2149 [consulta: 24 febrero 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.5897/AJB2007.000-2335>
34. Herrera, L., Valtierra Pacheco, E., Ocampo Fletes, I., Tornero Campante, M. A., y Hernandez Plascencia, A., 2017. Prácticas agroecológicas en *Agave tequilana* Weber bajo dos sistemas de cultivo en Tequila, Jalisco*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* [en línea], 18, no. 1, pp. 3713 - 3726 [consulta: 11 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263152571005>
35. Infante, D., Martínez, B., y Gonzalez, N., 2009. Mecanismos de acción de trichoderma frente a hongos. *Rev. Protección Veg* [en línea], 24, no. 1, pp. 14-21 [consulta: 1 diciembre 2020]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v24n1/rpv02109.pdf>
36. Jimenez, R., Virgen Calleros, G., Tabares Franco, S., y Olalde Portugal, V., 2001. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas: Agro-biotecnología. *Avance y Perspectiva* [en línea], 20, pp. 395-400 [consulta: 14 diciembre 2020]. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/es/revista/avance-y-perspectiva/articulo/bacterias-promotoras-del-crecimiento-de-plantas-agro-biotecnologia>
37. Kancab UC, Rosa Antonina, 2016. Diseño de un protocolo para la propagación in vitro de *agave parviflora* torr. mediante organogénesis directa [en línea]. Tesis de pregrado. Sonora: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. [consulta: 9 diciembre 2020]. Disponible en: https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/753/1/Kancab-Uc%20R%20A_MC_2016.pdf
38. Krzyzanowska, D.M., Potrykus, M., Golanowska, K., Polonis, A., Gwizdek Wisniewska, E., y Jafra. S., 2012. Rhizosphere bacteria as potencial biocontrol agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. strains. *Journal of Plant Pathology* [en línea], 94, no. 2, pp. 367-378 [consulta: 10 diciembre 2020]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4454/JPP.FA.2012.042>
39. Lim, J., Jee, D.H., Lee, E., Roh, K., Jung, C., y Heu, S., 2013. Biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Using Bacteriophage PP1. *J. Microbiology Biotechnology Biotechnology* [en línea], 23, no. 8, pp. 147-1153 [consulta: 10 diciembre 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23727798/>
40. Lopez Leon, O. M., 2013. Establecimiento de un protocolo para el inicio del cultivo in vitro de *agave letonae* (henequén) a partir de yemas axilares [en línea]. Tesis de pregrado. San Salvador: Universidad de el Salvador [consulta: 14 enero 2021]. Disponible en:

- <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/10032/1/19200950.pdf>
41. Masaquiza, Andrés, 2014. *Tzawar mishki es la bebida ancestral salasaca* [en línea] [consulta: 3 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.elcomercio.com/actualidad/ecuador/tzawar-mishki-salasacas-bebida-bebidas.html>
42. Minga, D. y Verdugo, A. 2016. Árboles y arbustos de los ríos de Cuenca Azuay-Ecuador [en línea], pp. 11 [consulta: 18 septiembre 2021]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Danilo-Minga/publication/303677294_Arboles_y_arbustos_de_los_rios_de_Cuenca_Azuay-Ecuador/links/5911bb62a6fdcc963e69a3ad/Arboles-y-arbustos-de-los-rios-de-Cuenca-Azuay-Ecuador.pdf
43. Mihaljevic, I., Dugalic, K., Tomas, V., Viljevac, M., Pranjic, A., Cmelik, Z., Puskar, B., y Jurkovic, Z., 2013. In vitro sterilization procedures for micropropagation of 'oblacinska' sour cherry. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, [en línea], 58, no. 2, pp. 117-126. [consulta: 15 febrero 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.2298/JAS1302117M>
44. Moreno Martínez, K.S., y Monja Mio, K.M., 2021. Cultivo in vitro de agaves. *Ciencia* [en línea], 72, no. 1, pp. 76-81 [consulta: 24 febrero 2021]. Disponible en: https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/72_1/PDF/12_72_1_1201_Cultivo_Agaves-L.pdf
45. Paneque, T., Polanco, M., Jiménez, C., y Piquera, Y., 2020. Estudio etnofarmacológico de algunas especies endémicas de agave utilizados en la medicina tradicional. *Revista Científica y Tecnológica UPSE* [en línea], 6, no. 2 [consulta: 2 diciembre 2020]. Disponible en: <https://incyt.upse.edu.ec/ciencia/revistas/index.php/rctu/article/view/471/450>
46. Pardo, O., 2005. Uso alimentario del Agave americano. *Revista Chilena de Flora y Vegetación. Chloris Chilensis* [en línea], 18, no. 2 [consulta: 5 diciembre 2020]. Disponible en: <http://chlorischile.cl/agavepardo/Agavetexto.htm>
47. Pérez, E., Chávez, M., y González, J., 2016. Review of agave and mezcal. *Revista Colombiana de Biotecnología* [en línea], 18, no. 1, pp. 148-164 [consulta: 11 diciembre 2020]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752016000100016&lng=es&nrm=iso&tlng=es
48. Pérez, Felix, 2013. Germinación y dormición de semillas [en línea] [consulta: 11 enero 2021]. Disponible en: https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicaciones-digitales/80-402-MATERIAL-VEGETAL-DE-REPRODUCCION__MANEJO-CONSER

VACION_Y_TRATAMIENTO/80-
402/7_GERMINACION_Y_DORMICION_DE_SEMILLAS.PDF

49. Petrzik, K., Brázdová, S., y Krawczyk, K., 2021. Novel Viruses That Lyse Plant and Human Strains of *Kosakonia cowanii*. *Viruses* [en línea], 13 [consulta: 10 enero 2021]. Disponible en: <file:///Users/apple/Downloads/viruses-13-01418.pdf>
50. Pierik, R. L. M., 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants* [en línea]. Boston [consulta: 4 diciembre 2020]. ISBN 978-94-011-5750-6. Disponible en: https://www.academia.edu/40263170/R_L_M_Pierik_1997_In_Vitro_Culture_of_Higher_Plants_Cultivo_de_Tejidos_Unisucre_ANTERAS_y_protoplastos_Generación_y_Aplicaciones_HAPLOIDES_n_
51. Piñuela Molina, J. R., 2001. Efecto de la pérdida de humedad en la germinación de semillas de alupay (*Euphoria didyma* Blanco) [en línea]. Tesis de pregrado. El Zamorano: Universidad Zamorano [consulta: 14 enero 2021]. Disponible en: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1470/1/CPA-2001-T074.pdf>
52. Ramírez, M., y Salazar, E., 1997. Establecimiento in vitro de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía* [en línea], 14, no. 5, pp. 497-506 [consulta: 17 enero 2021]. Disponible en: <https://produccioncientificaluz.org/index.php/agronomia/article/view/26150/26776>
53. Ramírez, M., Santos, R., y Isea, F., 2000. Hongos contaminantes en el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Psidium guajava* L. *Rev. Fac. Agron.* [en línea], 17, pp. 217-225 [consulta: 27 febrero 2021]. Disponible en: https://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/mayo_junio2000/ra3008.pdf
54. Razdan, M. K., 2003. *Introduction to Plant Tissue Culture* (Second Edition) [en línea]. New Hampshire: Enfield [consulta: 18 enero 2021]. ISBN: 1-57808-237-4 Disponible en: https://books.google.co.in/books?id=oe_lilY_tVsC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
55. Relloso, M., Nievas, J., Fares Taie, S., Farquharson, V., Mujica, M., Romano, V., Zarate, M., y Smayevsky, J., 2015. Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras. *Revista Argentina de Microbiología* [en línea], 47, no. 2, pp. 103-107 [consulta: 12 enero 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213039768004.pdf>
56. Rimap, 2004. Flora del barranco de Cuenca [en línea], [consulta: 19 septiembre 2021]. Disponible en : <http://www.congope.gob.ec/wp-content/uploads/2017/04/03FP08-0101-an-infC.pdf>

57. Rizwan, K., Zubair, M., Rasool, N., Muhammad, R., Zia-UI-Haq, M., & De Feo, V. (2012). Phytochemical and Biological Studies of *Agave attenuata*. *Int J Mol Sci*, 13(5), 6440-6451.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3382814/>
58. Roca, W., y Mroginski, L. A., 1991. *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones* [en línea]. Colombia: Cali [consulta: 20 diciembre 2020]. ISBN: 958-9183-15-8. Disponible en: <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/53954>
59. Rodríguez Fajardo, C. 2018. Potencialidades de industrialización y procesamiento de las agaváceas en el Ecuador (pencos y cabuyas). [consulta: 14 diciembre 2020].
60. Rodríguez L., Santiago Y., Rosales Y., Igarza Y., y Fernet e., 1999. *Cultivo In Vitro de Ananas comosus (L) Merr., (piña), cultivar cabezona, Coloquito internacional de biotecnología vegetal, libro de reportes cortos* [en línea] Cuba: Santa clara. [consulta: 24 febrero 2021]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/51107423/Biotecnologia-Vegetal>
61. Rodríguez Mendoza, C. A., Hernández, L. R., Pérez Armendáriz, B., y Juárez, Z. N., 2021. Bacterias y hongos endófitos de la familia Cactaceae y sus aplicaciones. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* [en línea], 24 [consulta: 9 enero 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2021.328>
62. Rossetti, S., 2014. Análisis de factores que afectan la germinación de semillas de *panicum coloratum* [en línea]. Tesis de pregrado. Argentina: Universidad Católica Argentina [consulta: 18 enero 2021]. Disponible en: <http://bibliotecadigital.uca.edu.ar/repositorio/tesis/analisis-factores-germinacion-panicum.pdf>
63. Ruiz, J., Aquino Bolaños, T., Delgado Gamboa, J. R., y Cortés Martínez, C. I., 2017. Manejo integrado y sostenible del agroecosistema maguey para el control de *scyphophorus acupunctatus* gyll. *Revista Mexicana de Agroecosistemas* [en línea], 4, no. 2, pp.124-132 [consulta: 1 diciembre 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/324953168_MANEJO_INTEGRADO_Y_SOSTENIBLE_DEL_AGROECOSISTEMA_MAGUEY_PARA_EL_CONTROL_DE_Scyphophorus_acupunctatus_Gyll_INTEGRATED_AND_SUSTAINABLE_AGAVE-AGROECOSYSTEM_MANAGEMENT_FOR_CONTROL_OF_Scyphophorus_acupunctatus
64. Sánchez, A., 2014. Preparación medios de cultivo [en línea]. Disponible en: <https://www.ugr.es/~cjl/medios%20de%20cultivo.pdf>
65. Sánchez Fernández, R. E., Sánchez Ortiz, B. L., Sandoval Espinosa, Y. K., Ulloa Benítez, Á., Armendáriz Guillén, B., García Méndez, M. C., y Macías

- Rubalcava, M. L., 2013. Hongos endófitos: Fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP* [en línea], 16, no. 2, pp. 132-146 [consulta: 1 diciembre 2020]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9)
66. Sánchez Granados, Diódoro, 1993. *Los agaves en México* [en línea]. México: Texcoco [consulta: 12 diciembre 2020]. ISBN: 968-884-225-7. Disponible en: http://biblioteca.uaaan.mx/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=29209&shelfbrowse_itemnumber=53292
67. Sathyanarayana, B. N., y Varghese, D. B., 2007. *Plant tissue culture: Practices and new experimental protocols* [en línea]. New Delhi [consulta: 21 enero 2021]. Disponible en: <https://www.worldcat.org/title/plant-tissue-culture-practices-and-new-experimental-protocols/oclc/294940813/viewport>
68. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2012). Hijo de maguey, mecate. Gobierno de México. <http://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/hijo-de-maguey-mecate>
69. Schulz, Barbara y Boyle, Christine, 2006. Microbial Root Endophytes. What are Endophytes? [en línea]. Berlin, Heidelberg [consulta: 8 diciembre 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/226535857_What_are_Endophytes
70. Schmidt, R. R., 1990. Investigation of mechanisms: The key to successful use of biotechnology. *Investigation of Mechanisms: The Key to Successful Use of Biotechnology* [en línea], 112, no. 82, pp. 1- 22 [consulta: 11 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/browse/journals-and-books>
71. Sharry, S. E., Adema, M., y Abedini, W., 2015. *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. [en línea]. Argentina: La Plata [consulta: 25 febrero 2021] ISBN: 978-950-34-1254-1. Disponible en: <https://doi.org/10.35537/10915/46738>
72. Suarez de Castro, Fernando, 1993. Agricultura, Biotecnología y Propiedad Intelectual [en línea]. San José ISSN:0534-539 [consulta: 14 enero 2021]. Disponible en: <http://repiica.iica.int/docs/B1075e/B1075e.pdf>
73. Taiz, L., y Zeiger, E., 2006. *Fisiología vegetal: Vol. I*. [en línea]. España: Castelló [consulta: 8 febrero 2021] ISBN: 978-848021-601-2. Disponible en: <https://fisiologiavegetalundec.files.wordpress.com/2018/04/fv-taiz-zeiger-vol-i.pdf>
74. Torres, K. C., 2012. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. [en línea]. Estados Unidos: New York [consulta: 11 febrero 2021] ISBN 978-1-4615-9756-8. Disponible en: <https://sites.google.com/a/fn.books-now.com/en454/9780442284657-37gemoGEcontgram80>

75. Trigiano, R. N., y Gray, D. J., 2005. *Plant development and biotechnology*. CRC Press [en línea]. Estados Unidos: New York [consulta: 4 febrero 2021] ISBN 0-8493-1614-6. Disponible en: <https://thunderbooks.files.wordpress.com/2009/06/plant-development-and-biotechnology.pdf>
76. Unido, 2004. *Manual for the in Vitro Culture of Agaves* [en línea]. Disponible en: <https://open.unido.org/api/documents/4788649/download/MANUAL%20FOR%20THE%20IN%20VITRO%20CULTURE%20OF%20AGAVES.%20COMMON%20FUND%20FOR%20COMMODITIES%20TECHNICAL%20PAPER%20NO.%2038%20%2823470.en%29>
77. Valenzuela, A. G., 2000. *Tequila Cazadores: Manual para agaveros*. Agaveros y Ganaderos de Arandas [en línea]. México: México [consulta: 9 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.worldcat.org/title/tequila-cazadores-manual-para-agaveros/oclc/689518044>
78. Vargas, D. A., 2012. Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de semillas de *Cattleya violacea* [en línea]. Tesis de pregrado. Guayaquil: Universidad de Guayaquil [consulta: 18 enero 2021]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1671/1/Establecimiento%20de%20un%20protocolo%20para%20el%20cultivo%20in%20vitro%20de%20semillas%20de%20Cattleya%20violace.%20Vargas%2c%20Daniela.pdf>
79. Velázquez, M. J., 2013. Biocontrol in vitro de *Rhizoctonia* spp. Con *Trichoderma* spp. Y bacterias de potencial antagónico, para un posterior uso en lechuga (*Lactuca sativa*L.) [en línea]. Tesis de pregrado. Estado de México: Universidad Autónoma del Estado de México [consulta: 7 diciembre 2020]. Disponible en: <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/21862/Tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
80. Villa Martínez, A., Pérez Leal, R., Morales Morales, H. A., Basurto Sotelo, M., Soto Parra, J. M., y Martínez Escudero, E., 2014. Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica* [en línea], 64, no. 2, pp. 194-205 [consulta: 10 enero 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358>
81. Villalobos, V.M., y Thorpe, T.A., 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados [en línea]. [consulta: 21 enero 2021]. Disponible en: <https://agriperfiles.agri-d.net/display/n2379>

XII. ANEXO 1



Imagen 1. Lavado de plantas previo al proceso de desinfección

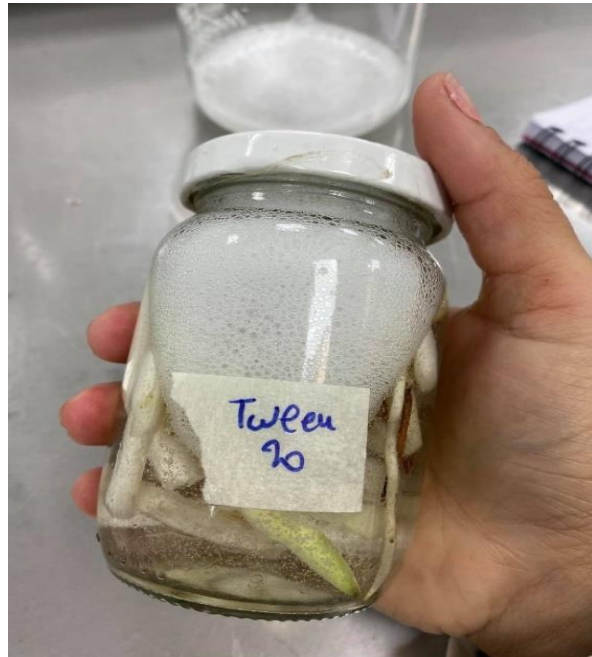


Imagen 2. Enjuagues con tween 20

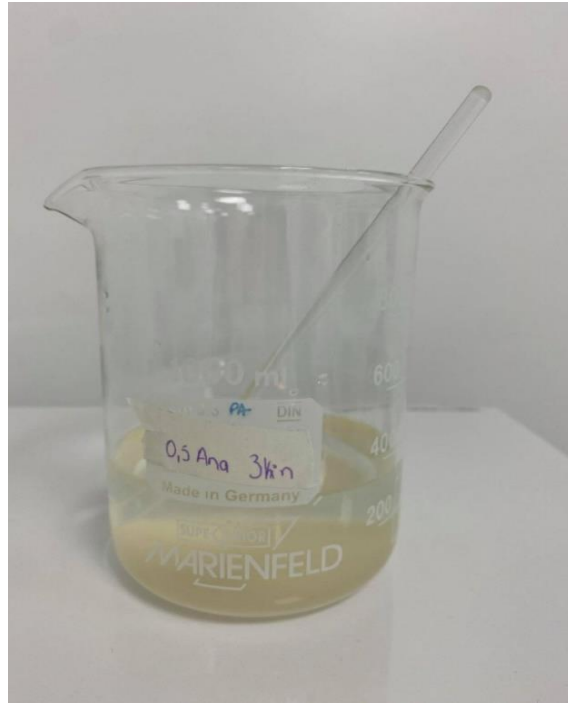


Imagen 3. Preparación de medios de cultivo



Imagen 4. Explantes para empezar el proceso de desinfección



Imagen 5. Traspaso del alcohol al cloro



Imagen 6. Proceso de cuarentena



Imagen 7. Tratamientos en observación



Imagen 8. Plantas sanas



Imagen 9. Observación de primeras plantas infectadas



Imagen 10. Brotes de callos



Imagen 11. Explantes infectados



Imagen 12. Planta de *Agave Americana* var. Bicolor

Anexo 2. Informe de originalidad

TESIS AGAVE AMERICANA

INFORME DE ORIGINALIDAD

8%

INDICE DE SIMILITUD

8%

FUENTES DE INTERNET

2%

PUBLICACIONES

1%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
2	dspace.ups.edu.ec Fuente de Internet	1%
3	docplayer.es Fuente de Internet	1%
4	repositorio.cucba.udg.mx:8080 Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Chulalongkorn University Trabajo del estudiante	<1%
6	www.voaxaca.tecnm.mx Fuente de Internet	<1%
7	www.revistas.unitru.edu.pe Fuente de Internet	<1%
8	ciad.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	<1%
9	tesis.ipn.mx Fuente de Internet	<1%

10	www.ciatej.mx Fuente de Internet	<1 %
11	Clara Angélica Rodríguez-Mendoza, Luis Ricardo Hernández, Beatriz Pérez-Armendáriz, Zaida Nelly Juárez. "Bacterias y hongos endófitos de la familia Cactaceae y sus aplicaciones", TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2021 Publicación	<1 %
12	María S. Relloso, Jimena Nievas, Santiago Fares Taie, Victoria Farquharson et al. "Evaluación de la espectrometría de masas: MALDI-TOF MS para la identificación rápida y confiable de levaduras", Revista Argentina de Microbiología, 2015 Publicación	<1 %
13	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
14	dspace.esPOCH.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
15	revistas.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
16	dspace.ucuenca.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
17	riudg.udg.mx Fuente de Internet	<1 %

18	A.C.R. Pinto, M.E.S.P. Demattê, D.M.M. Santos, J.C. Barbosa, S. Creste. "GROWTH REGULATORS FOR IN VITRO PROPAGATION OF TILLANDSIA GARDNERI (BROMELIACEAE)", <i>Acta Horticulturae</i> , 2013 Publicación	<1 %
19	doczz.es Fuente de Internet	<1 %
20	doczz.net Fuente de Internet	<1 %
21	www.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
22	bdigital.zamorano.edu Fuente de Internet	<1 %
23	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	<1 %
24	repositorio.utc.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
25	issuu.com Fuente de Internet	<1 %
26	repositorio.unheval.edu.pe Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas Activo

Excluir bibliografía Activo

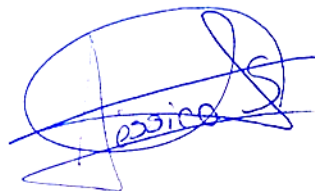
Excluir coincidencias < 15 words

Anexo 3. Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Declaratoria de Autoría y Responsabilidad

Jessica Paulina Sanmartín Yunga portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0106744824**. Declaro ser el autor de la obra: “**Propagación “*in vitro*” del penco bicolor (*Agave americana*) para la flora urbana de la ciudad de Cuenca**”, sobre la cual me hago responsable sobre las opiniones, versiones e ideas expresadas. Declaro que la misma ha sido elaborada respetando los derechos de propiedad intelectual de terceros y eximo a la Universidad Católica de Cuenca sobre cualquier reclamación que pudiera existir al respecto. Declaro finalmente que mi obra ha sido realizada cumpliendo con todos los requisitos legales, éticos y bioéticos de investigación, que la misma no incumple con la normativa nacional e internacional en el área específica de investigación, sobre la que también me responsabilizo y eximo a la Universidad Católica de Cuenca de toda reclamación al respecto.

Cuenca, **29 de septiembre de 2021**

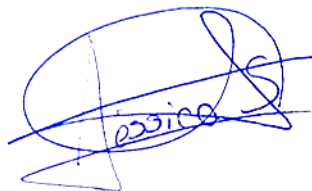


F:
Jessica Paulina Sanmartín Yunga
C.I. 0106744824

Anexo 4. Autorización de publicación en el repositorio institucional.

Jessica Paulina Sanmartín Yunga portador(a) de la cédula de ciudadanía N° **0106744824**. En calidad de autor/a y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “**Propagación “*in vitro*” del penco bicolor (*Agave americana*) para la flora urbana de la ciudad de Cuenca**” de conformidad a lo establecido en el artículo 114 Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos y no comerciales. Autorizo además a la Universidad Católica de Cuenca, para que realice la publicación de éste trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, **29 de septiembre de 2021**



F:

Jessica Paulina Sanmartín Yunga
C.I. **0106744824**