



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



**GERMINACIÓN Y VIABILIDAD SEMINAL DE *Agave angustifolia* subsp.
tequilana y *Agave mapisaga***

Por:

Reyna Niño Vazquez

**Proyecto de tesis profesional presentado como un requisito parcial para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista**

Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.

Septiembre 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA



**GERMINACIÓN Y VIABILIDAD SEMINAL DE *Agave angustifolia* subsp.
tequilana y *Agave mapisaga***

Por:

Reyna Niño Vazquez

**Proyecto de tesis profesional presentado como un requisito parcial para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista**

ASESORES

Dr. Hugo Magdaleno Ramírez Tobías

Dr. Ramón Jarquín Gálvez

Dr. Jorge Alonso Alcalá Jáuregui

PÁGINA DE APROBACIÓN

El trabajo titulado “**GERMINACIÓN Y VIABILIDAD SEMINAL DE *Agave angustifolia* subsp. *tequilana* y *Agave mapisaga***” fue realizado por: **Reyna Niño Vazquez**, como requisito parcial para obtener el título de “**Ingeniero Agrónomo Fitotecnista**” y fue revisado y aprobado por el suscrito comité de tesis.

Dr. Hugo Magdaleno Ramírez Tobías

Asesor

Dr. Ramón Jarquín Gálvez

Asesor

Dr. Jorge Alonso Alcalá Jáuregui

Asesor

Ejido Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. a 27 días del mes de Agosto del 2013

DEDICATORIA

A MI HIJO:

Lo más valioso de mi existencia, el milagro que gesto mi ser... doy gracias a la vida por darme la dicha de ser tu madre, de disfrutar tu sonrisa y verte crecer cada día, quiero que sepas que todos mis esfuerzos y logros son gracias a ti, eres lo más importante y preciado que tengo, porque gracias a ti conozco el verdadero significado de la palabra amar, esto es para ti... mi pequeño Angel en la tierra.

Tu mami

A MIS PADRES:

(Antonio y Balbina)

No nombrare todas las razones por las que los amo pues no terminaría, solo diré que me siento muy orgullosa y feliz de ser su hija, se que con trabajo y esfuerzo se logran muchas cosas, pero sin el cariño y apoyo de ustedes no lo hubiera logrado, gracias por estar conmigo apoyándome en cada paso que doy, por darme la confianza el apoyo y el amor para poder llegar hasta aquí; este logro se los debo a ustedes por que pese a las dificultades u obstáculos que la vida me pudo dar, nunca dudaron de mi, y me apoyaron en todo momento, "Gracias por estas alas que crearon con su ejemplo y que se que me han de llevar muy alto".

Su hija

A MIS HERMANOS:

Ruby, Nelly, Gema, Antonio, Arturo y Juan, gran parte de lo que soy se los debo a ustedes, por que los recuerdos más bonitos de mi vida los tengo a su lado. Gracias por ser parte de mi vida y por regalarme risas, peleas, juegos, consejos, tristezas y alegrías.

Su hermana

Reyna Niño Vazquez

AGRADECIMIENTOS

A la UASLP, por darme la oportunidad de ser una alumna en su institución.

A la Facultad de Agronomía y Veterinaria, por permitir formarme en sus aulas, campos y laboratorios como una profesionista más.

A mi asesor, Dr. Hugo M. Ramírez Tobías, agradezco su amabilidad y tolerancia como maestro y tutor, pero principalmente su sensibilidad como persona, su paciencia y apoyo en las diversas situaciones que pase este tiempo, pero principalmente por confiar en mí para elaborar esta investigación, apoyándome y guiándome en todo momento.

A los profesores de la Facultad De Agronomía y veterinaria, gracias por compartir sus conocimientos, transmitirme aprendizaje y contribuir en mi formación profesional.

A los miembros de mi comité de tesis al Dr. Ramón Jarquín Gálvez y al Dr. Jorge Alonso Alcalá Jáuregui, por sus observaciones y consejos, gracias.

Dr. José Luis Flores Flores, por facilítame su cámara de crecimiento para realizar los experimentos de germinación

A la Dra. Erika García Chávez, por permitir que laborara en su laboratorio para realizar mis observaciones diarias.

Al Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera, por proporcionarme semilla de *Agave angustifolia subsp. tequilana* para el término de esta investigación.

A la Dra. Claudia González Salvatierra y al Dr. Joel David Flores Rivas, por contribuir a mi práctica para realizar la prueba de bioquímica por tetrazolio, por su disponibilidad, paciencia, apoyo y consejos gracias.

A Eloy Morgado Gonzales, gracias por toda tu paciencia, por caminar a mi lado, apoyarme y no soltar mi mano.

A mis amigos, Pedro, Noemí, Maricruz y Omar gracias por brindarme su amistad que es algo invaluable.

Aquellos que involuntariamente omití...

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	vi
INDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	x
SUMMARY	xi
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Generalidades.....	4
Propagación de Agave	4
Inflorescencia.....	5
Floración de Agave.....	5
Semillas.....	6
Germinación de Semillas	6
Procesos Fisiológicos de Agave	6
Prueba Bioquímica de Viabilidad con Tetrazolio.....	7
Métodos de Evaluación de la Germinación	7
Métodos descriptivos.....	8
Gráficas de capacidad de germinación.....	8
Gráficas de germinación diaria.	8
Gráficas de germinación acumulada por intervalos de tiempo.	8
Métodos analíticos.....	8
Tiempo de latencia	8
Pendiente de la porción lineal	8
Coeficiente de velocidad	8
Tiempo promedio de la germinación	9
Índice de germinación.	9

Índice de Abbot.....	9
Velocidad de germinación.....	10
Coefficiente de Timson	10
Valor de germinación	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Material Vegetal y Establecimiento de Experimentos.....	11
Prueba Bioquímica de Viabilidad (Prueba por Tetrazolio).	12
Diseño Experimental y Análisis de Datos	13
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
Imbibición.....	14
Imbibición Máxima por Temperatura.....	15
Imbibición Promedio por Especie.....	16
Dinámica de Germinación en el Tiempo	18
Valor Máximo de la Germinación Acumulada.....	20
Viabilidad.....	21
CONCLUSIONES	24
LITERATURA CITADA	25

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Parámetro a considerar las semillas germinadas de <i>A. angustifolia</i> subsp. <i>tequilana</i> y de <i>A. mapisaga</i>	13
2	Dinámica de imbibición de las semillas a las primeras 48 horas, de <i>A. angustifolia</i> subsp. <i>Tequilana</i> y <i>A. mapisaga</i> (—+— 15, —●— 20, —◆— 25, —▲— 30, —■— 35 y —★— 40 °C).....	15
3	Imbibición promedio de <i>A. mapisaga</i> y <i>A. angustifolia</i> subsp. <i>tequilana</i> , en temperaturas de 15 a 40 °C respectivamente. Letras distintas en cada una de las barras indican diferencias estadísticas entre temperaturas, según la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$	17
4	Diferencia en porcentaje de la imbibición promedio que tubo cada especie  <i>A. mapisaga</i> y  <i>A. angustifolia</i> subsp. <i>tequilana</i> . Las barras indican el error estándar.....	18
5	Diferencia en tamaño de semillas entre las dos especies estudiadas a) <i>A. mapisaga</i> , b) <i>A. angustifolia</i> subsp. <i>Tequilana</i>	18
6	Efecto de la temperatura sobre la germinación acumulada en semillas de <i>A. angustifolia</i> subsp. <i>tequilana</i> y <i>A. mapisaga</i> .(—+— 15, —●— 20, —◆— 25, —▲— 30, —■— 35 y —★— 40 °C).....	20
7	Germinación máxima de dos especies de <i>Agave</i> en diferentes temperaturas. Las letras distintas en cada una de las barras indican diferencias estadísticas entre temperaturas, según la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$. <i>A. mapisaga</i>  y <i>A. angustifolia</i> subsp. <i>tequilana</i> 	21

8	La figura muestra la viabilidad que se registro a diferentes horas, donde se encontraron semillas  viables,  inviábiles y  sin embrión. <i>A. angustifolia</i> subsp. <i>tequilana</i> y <i>A. mapisaga</i> . Las barras de dispersión significan un error estándar y las literales en cada media señalan diferencias estadísticas según la prueba de Tukey con $\alpha= 0.05$, $n= 5$	23
9	Comparación de semillas de <i>A .angustifolia</i> subsp. <i>tequilana</i> , semilla normal con embrión y sin embrión.....	24

RESUMEN

Las plantas del género *Agave* han provisto al ser humano de diversos materiales que le han servido como alimento, bebida, protección y medicina. Los magueyes pueden reproducirse sexual y asexualmente, tradicionalmente se reproducen por hijuelos y bulbilos. Este tipo de reproducción favorece el establecimiento exitoso del plantío, pero también homogeniza las poblaciones haciéndolo susceptible al ataque de plagas y enfermedades. Esto muestra la necesidad de aumentar la variabilidad genética en plantaciones de *Agave*, lo que puede lograrse mediante la propagación por semillas. El objetivo de esta tesis fue caracterizar la germinación y su relación con la temperatura, y conocer la viabilidad seminal en *Agave angustifolia* subsp. *tequilana* y *A. mapisaga*. Las semillas se sembraron en cajas de petri con un sustrato de algodón y papel filtro humedecidos con agua destilada. En cada caja se colocaron 20 semillas, que constituyeron una unidad experimental que fue repetida 5 veces. Las cajas se colocaron en una germinadora a las temperaturas constantes de 15, 20, 25, 30 y 35 °C. Se registró la imbibición como aumento de peso y la germinación en el tiempo durante 30 d. La viabilidad se evaluó a las 24, 48 y 72 h después de colocar las semillas en una solución de 2,3,5- trifenil tetrazolio al 1%. Los datos obtenidos fueron evaluados con el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de Tukey. Las semillas absorbieron agua de acuerdo con las tres fases de imbibición conocidas. Las semillas de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* embebieron 57% más agua que las de *A. mapisaga*. La imbibición promedio aumentó con la temperatura, de 160% en 15 °C a 210% en 35 °C. *Agave mapisaga* presentó una germinación de 70% en contraste de las semillas de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* que germinaron al 26%. *Agave angustifolia* subsp. *tequilana* presentó una proporción de semilla inviable de 53% y sin embrión de 28%. La germinación y viabilidad seminal baja de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* sugiere problemas reproductivos, lo cual puede deberse a su escasa reproducción sexual. En contraste la germinación y viabilidad *A. mapisaga* fueron normales.

SUMMARY

The *Agave* plants have provided humans from various materials that have served as food, drink, protection and medicine. The maguey can reproduce both sexually and asexually reproduce by runners traditionally and bulbils. This type of reproduction favors the successful establishment of the plantation, but also homogenizes the populations making it susceptible to attack by pests and diseases. This shows the need to increase the genetic variability in *Agave* plantations, which can be achieved by seed propagation. The aim of this thesis was to characterize the germination and its relationship with temperature, and assess the viability seminal *Agave angustifolia* subsp. *tequilana* and *A. mapisaga*. Seeds were sown in Petri dishes with a substrate of cotton moistened filter paper with distilled water. In each box is placed 20 seeds, which constituted an experimental unit that was repeated 5 times. The boxes were placed in a germinating constant temperatures 15, 20, 25, 30 and 35 ° C. Were recorded as weight gain imbibitions and germination time for 30 d. Viability was assessed at 24, 48 and 72 h after placing the seeds in a solution of 2,3,5 – triphenyl tetrazolium 1%. Data were evaluated with analysis of variance (ANOVA) and Tukey's comparison test. Water absorbed seeds according to the three phases of embedding known. The seeds of *A. angustifolia* subsp. *tequilana* imbibed 57% more water than those of *A. mapisaga*. Imbibitions increased with the temperature average of 160% in 15 to 210% at 35 ° C. *A. mapisaga* presented a 70% germination of seed contrast *A. angustifolia* subsp. *tequilana* that germinated to 26%. *A. angustifolia* subsp. *tequilana* presented a viable seed ratio of 53% and 28% without embryo. Germination and viability of *A. angustifolia* subsp. *tequilana* seminal suggests low reproductive problems, which may be due to low sexual reproduction. In contrast germination and viability *A. mapisaga* were normal.

INTRODUCCIÓN

México es escenario del origen y evolución del género *Agave*. Estas plantas, conocidas como magueyes, han sido utilizadas para satisfacer y complementar necesidades básicas del ser humano (Granados, 1993). Los magueyes son plantas adaptadas a condiciones de aridez, presentan raíces ramificadas y someras, poseen cutícula gruesa, son suculentas, tienen estomas hundidos y son perennes monocárpicas. Además, realizan metabolismo fotosintético tipo CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas, por sus siglas en inglés). De acuerdo con Aguirre *et al.*, (2001) estos son algunos de los atributos que le permiten establecerse en zonas carentes de agua.

En México existe el 75 % de las especies, por lo cual es considerado como centro de origen del género (Granados, 1993). De este porcentaje varios han sido aprovechados para proveer alimento, techo, protección y medicina a diferentes culturas, así como para la producción de fibras o bebidas alcohólicas como el tequila, el pulque y el mezcal. La preparación de estas bebidas es la más importante actividad económica asociada con el cultivo de *Agave* (Piven *et al.*, 2001), ya que en lo que va del año (enero- julio 2013) se han utilizado 454.3 miles de toneladas de *Agave* para producción de tequila y se produjo una exportación de 107.8 millones de litros a diferentes países, una cifra bastante considerable ya que en 2012 la producción total fue de 253.2 millones de litros (Consejo Regulador Del Tequila, 2013). Cabe destacar también el reconocimiento de que los magueyes almacenan sus reservas como fructanos y la importancia creciente de estos polisacáridos en la alimentación saludable justifica el estudio de estos recursos fitogenéticos (Mora-López *et al.*, 2011). Algunas especies de *Agave* se consideran un recurso natural económico utilizado para tratar diversas enfermedades, proponiéndose como una opción médica terapéutica efectiva no tóxica y de muy bajo precio que se está acabando, con las pencas se preparan específicamente ungüentos o cataplasmas; las saponinas identificadas en los *Agaves* sirven como producto de partida para sintetizar cortisona y hormonas sexuales para producir anticonceptivos, también registrándose su uso como antídoto contra picadura de animales ponzoñosos. Ayón-peña, (2007).

Perez, *et al.* (2003) menciona que existen especies de *Agave* consideradas como medicinales, una de ellas es *A. mapisaga*, dichos usos son extensos de los cuales sobresale el tratamiento del cáncer y la leucemia, ya que se han realizado estudios en animales comprobando su eficacia.

Todas estas cualidades han sido transmitidas de generación en generación, no obstante y pese a la importancia de esta noble planta, en los albores del siglo XXI, debido a la explotación irracional, a lo inadecuado de su siembra así como a las políticas tendientes a sustituir el uso de fibras naturales por sintéticas y del pulque y el mezcal por otras bebidas como la cerveza y brandi, el uso de maguey y sus derivados han ido desapareciendo. En la actualidad a nivel laboratorio se continúan investigaciones para mejorar su aprovechamiento industrial (elaboración de celulosa, fructuosa, papel moneda, insulina, plásticos, forrajes, etc.). Ayón-peña, (2007).

Por su parte García-Herrera *et al.*, (2010) comenta que los *Agaves* desde épocas precolombinas destacan en importancia por el uso que se les ha dado, actualmente este recurso aunque con problemas en su uso y manejo, recobra vigencia desde el punto de vista socioeconómico y agroecológico por los beneficios que trae a los pobladores del medio rural y al medio ambiente donde se desarrolla, ya que es usado en la conservación de suelos para mantener el equilibrio del hábitat propio del entorno donde crece. Lo que nos lleva a fomentar la investigación de la reproducción y el rescate de esta valiosa planta para el pueblo mexicano. Debido a la antigua e intensa relación entre los humanos y el *Agave* hay variantes con importancia regional, nacional e internacional, de las cuales hay un conocimiento tradicional considerable y una variación morfológica alta (Colunga *et al.*, 1996). Tal es el caso de *A. mapisaga* que es utilizado para la producción de aguamiel, mezcal y fibra, por tal motivo tiene grado de humanización alto. Mora-Lopez *et al.* (2011) en su investigación sólo llegó a encontrar esta especie en ambientes muy humanizados, es decir, en plantaciones comerciales, de tal manera que la denominaron la especie más domesticada dentro de sus taxones. Los magueyes pueden reproducirse sexual y asexualmente, tradicionalmente la propagación se realiza a través de hijuelos y bulbilos, según Rendón (1990), una planta puede llegar a tener hasta 50 hijuelos. La propagación asexual también se debe a que se cree que las semillas de los magueyes son inviábiles, y se ha señalado que muchas especies de *Agave* de interés comercial tal es el

caso de *Agave angustifolia* subsp. *tequilana* se propagan sólo por hijuelos (Aguirre *et al.*, 2001). La propagación asexual favorece el establecimiento exitoso de la plántula. Por otro lado, cuando la propagación se realiza para producir materia prima para algunas bebidas, se argumenta que con propagación vegetativa, el tiempo para la maduración de la planta y su cosecha es menor que si se propaga por semilla (Granados, 1993). No obstante, la homogeneidad que se genera con la propagación asexual propicia mayor susceptibilidad al ataque de plagas y enfermedades, esto muestra la necesidad de aumentar la variabilidad genética en las plantaciones de *Agave* (Valenzuela-Zapata y Nabhan, 2003). La variabilidad genética puede lograrse mediante la propagación a través de semilla, sobretodo, si se considera que la propagación con plántones producidos a partir de semilla podría competir favorablemente con la propagación por hijuelos (Aguirre *et al.*, 2001). Diversas investigaciones señalan que las semillas de *Agave* son viables y carecen de latencia (Freeman *et al.*, 1977; Pritchard y Miller, 1995; Peña-Valdivia *et al.*, 2006; Ramírez-Tobías *et al.*, 2012). Tal información sobre la capacidad de germinación de especies de *Agave* aumenta la posibilidad de su propagación sexual.

En el caso de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* no existen plantíos derivados de semilla, esto debido a la practica de eliminación de la inflorescencia tan pronto como emerge para la conservación de los azucares, ya que para la producción de tequila al menos el 51% de los azucares debe de proceder de este *Agave* (Diario Oficial de la Federación, 1993). Los datos sobre la producción de semillas y la eficiencia de la germinación están disponibles para unas pocas especies de *Agave* (Escobar-Guzman *et al.*, 2008), siendo *A. mapisaga* una especie de la que casi nada se conoce a cerca de la producción de semilla y la eficiencia de la germinación (o existen muy pocos datos disponibles), por ser una especie reproducida principalmente por hijuelos.

Los factores que conducen a bajos niveles de germinación y viabilidad de las plántulas no se han investigado en detalle, aunque Ramírez-Tobías (2010) ha informado de bajas eficiencias de germinación para el caso de *Agave angustifolia* subsp. *tequilana*, tal afirmación plantea la pregunta sobre la viabilidad de estas semillas. Por todo lo anterior esta investigación pretende caracterizar la germinación de dos especies de *Agave* (*Agave angustifolia* subsp. *tequilana* y *Agave mapisaga*) en relación con la

temperatura, ya que se tiene la sospecha de que las semillas presentarían germinación elevada en una temperatura o amplitud de temperatura determinado.

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades

Mesoamérica y Aridoamérica (como los antropólogos han dividido a México) es escenario del origen y evolución del maguey (*Agave* spp.). En ambas regiones esta planta ha sido utilizada desde los primeros pobladores, hasta la actualidad, para satisfacer y complementar una serie de necesidades básicas. Cabe resaltar que de este vegetal se obtienen bebidas embriagantes como el pulque y el mezcal (Diodoro Granados, 1993).

El género *Agave*, cuyo significado es "noble" o "admirable" fue dado a conocer a la ciencia en 1753. Las plantas del género *Agave* son originarias del continente americano, con la mayor concentración de especies nativas de México (aproximadamente el 75 %) en donde se les conoce con los nombres comunes de "magueyes" o "mezcales" (Valenzuela Zapata, 2003)

Taxonómicamente el género *Agave* se ubica en la familia *Agavaceae*, los magueyes son plantas adaptadas a condiciones de aridez, con raíces someras y ramificadas, cutícula gruesa, succulencia y estomas hundidos. Estos son algunos de los atributos que le permiten establecerse en zonas carentes de agua (Aguirre *et al.*, 2001).

Propagación de *Agave*

Los magueyes pueden reproducirse sexual y asexualmente, y producen abundante semilla. La propagación de *Agave* se realiza tradicionalmente de manera asexual, a través de hijuelos, en la naturaleza esta forma de propagación favorece el establecimiento exitoso de la plántula (Granados, 1993).

La producción de plántones a partir de semillas históricamente se ha desestimado, porque aparentemente toma más tiempo para que la planta alcance su madurez, pero en ello nunca se toma en cuenta la edad de los hijuelos al momento de plantarse; sin embargo, con los materiales y facilidades disponibles en la actualidad parece factible la producción masiva de plántones a partir de la semilla, los cuales al establecerse, sin interrumpir su crecimiento, podrían competir favorablemente en edad real a la madurez con los plántones de hijuelos. Cabe señalar que la semilla de maguey es muy abundante y carece de latencia, presenta una alta viabilidad y su germinación es rápida y uniforme (Aguirre *et al.*, 2001).

Inflorescencia

Una vez retraído el meristemo apical vegetativo, da pauta a la formación de un meristemo floral, ya iniciada la inflorescencia (o quíote) cubierto de brácteas, se somete a un periodo de crecimiento rápido (hasta 5 cm por día) hasta alcanzar una altura de alrededor de 5-6 m. A una altura de aproximadamente alrededor de 4 m, las ramas laterales o umbrelas comienzan a formar la inflorescencia. Gentry (1982) informó la existencia de 20-25 umbrelas por planta, cada una capaz de producir cientos de flores.

Floración de *Agave*

Las flores se presentan desde junio hasta septiembre, miden aproximadamente de 30 a 50 mm de largo, tubulares y marcadamente protándricas (en el transcurso de una semana una panícula hace la transición desde la condición primordialmente masculina a un estado pistilado femenino). Después de la polinización del ovario, se desarrolla una capsula seca que contiene cientos de semillas, de forma triangular de unos 5 a 8 mm de largo; cada fruto maduro contiene aproximadamente 216 semillas, sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de semillas aproximadamente el 84 % sufren mortalidad por desecación. (Granados, 1993).

Semillas

Las semillas son estructuras reproductoras que garantizan la supervivencia del embrión desde que este se separa de la planta progenitora hasta que se inicia el crecimiento de la plántula (Labrada, 2005).

Las semillas son resistentes a la desecación, poseen reservas nutritivas y, además, pueden presentar latencia, solo germinaran cuando las condiciones ambientales permitan el optimo crecimiento, el control inicial de la germinación es esencial para la supervivencia de las especies (Simón-Martínez *et al.*, 2006).

Germinación de Semillas

La germinación es el proceso fisiológico por medio del cual se reinicia el crecimiento del embrión, comienza con la imbibición de la semilla y termina cuando emerge la radícula. (Bewley y Black, 1994).

Procesos Fisiológicos de *Agave*

Los procesos fisiológicos como la germinación y el crecimiento de las especies de *Agave* son modificados por los factores ambientales en función de las características climáticas prevalecientes en las áreas de distribución de las especies (Ramírez-Tobías, 2010).

Así, se postula que el factor ambiental más importante que regula la germinación y latencia es la temperatura (Baskin y Baskin, 1988; Hilhorst, 1998). Tal regulación de la germinación por los factores ambientales tiene repercusiones ecológicas al permitir el inicio de la repoblación en las condiciones ambientales adecuadas (Probert, 2000).

Prueba Bioquímica de Viabilidad con Tetrazolio

Geory Lakon desarrollo esta metodología para probar la viabilidad de las semillas. Esta prueba tiene como propósito mostrar lo viable que es una semilla para producir una plántula normal (mediante su potencial de actividad bioquímica), las semillas no viables muestran deficiencias y/ o anomalías de naturaleza para producir una plántula de desarrollo normal (Labrada, 2005).

El objetivo de la prueba de tetrazolio es, realizar una estimación rápida de viabilidad de las muestras de semillas en general. Esta prueba evalúa con base en patrones de tinción y permite identificar actividad enzimática en tejidos (R. Labrada, 2005)

La prueba de viabilidad se realiza de la siguiente manera. Se utiliza una solución incolora de la sal cloruro de 2, 3,5 – trifenil tetrazolio al 1 ó 5% (según sea el caso) como un indicador de varios procesos de reducción que ocurren en las células vivas cuando se tiene actividad bioquímica. Una vez que la solución de tetrazolio es absorbida por la semilla, en las células vivas de los tejidos se lleva a cabo una reacción química de óxido-reducción, en la cual participan las enzimas deshidrogenasas (presentes en los tejidos vivos), en esta reacción los protones hidrogeno liberados (en el proceso de respiración) reducen a la sal de tetrazolio a formazan. El formazan es una sustancia estable, no difusible, de color rojiza, que permite distinguir las áreas vivas de las semillas, de manera particular, del embrión. De esta forma, los embriones que se tiñen de rojo se consideran viables (Peters, 2000).

El color de las semillas es un factor muy importante, indicativo y determinante de la viabilidad, pero durante el proceso de evaluación, también debe tenerse en cuenta otros aspectos que ayudan a la interpretación y clasificación de las semillas en los distintos niveles de viabilidad (Labrada, 2005).

Métodos de Evaluación de la Germinación

Los métodos de análisis de la germinación pueden diferenciarse en dos tipos.

1) Descriptivos o gráficos, permiten hacer una evaluación preliminar de los resultados.

2) Analíticos, los cuales consisten en la aplicación de funciones matemáticas que describen el comportamiento germinativo de las semillas.

Métodos descriptivos

Gráficas de capacidad de germinación. Se grafica el número final de semillas germinadas o el porcentaje final de germinación en cada tratamiento. En estas graficas se observa el efecto de los tratamientos en la capacidad germinativa, pero no muestran como fue la distribución de la germinación en el tiempo.

Gráficas de germinación diaria. Muestran el número de semillas que germinaron cada día. Describen la distribución de la germinación en el tiempo, por lo que se observa que tan cercana es a una distribución normal (la uniformidad) y el día en el que se logra el máximo número de semillas germinadas.

Gráficas de germinación acumulada por intervalos de tiempo. Muestran la máxima capacidad de germinación y el tiempo (días) en que se alcanza, la forma en que se incrementa la germinación, y su tiempo de inicio. Pero carece de los parámetros precisos de comparación. (González-Zertuche y Orozco-Segovia, 1996)

Métodos analíticos

Los índices de germinación son formulas en las que se trata de relacionar los diferentes parámetros de la germinación (González-Zertuche y Orozco-Segovia, 1996)

Tiempo de latencia. Tiempo necesario para el inicio de la germinación, las diferencias se pueden determinar mejor cuando se grafica el inverso del tiempo (Come, 1968)

Pendiente de la porción lineal. Es el porcentaje de semillas que germinaron en los primeros dos días, después del inicio de la germinación (Come, 1968). El autor únicamente propone comparar los datos de los dos primeros días, pero seria más útil considerar el porcentaje de germinación acumulado hasta el punto de inflexión de la curva.

Coeficiente de velocidad. Este índice se basa en el número de semillas germinadas inversamente relacionado con el tiempo y el número de semillas germinadas por día.

$$CV = \frac{\sum n_i}{\sum n_i t} 100$$

Donde CV= coeficiente de velocidad, n_i =numero de semillas germinadas el día i , t_i = número de días desde la siembra. (Kotowsky, 1926).

Es una medida de la distribución de la germinación en el tiempo, en relación con el número de semillas germinadas, índice más comúnmente utilizado, sin embargo, no es estrictamente el valor de la velocidad, sino el recíproco del tiempo medio de germinación (Heydecker, 1973).

Tiempo promedio de la germinación. Según Gordon (1971), resistencia a la germinación o inverso del coeficiente de velocidad según Harrington (1962). Es una medida del tiempo promedio de la germinación que necesitan las semillas para germinar.

$$T = \frac{\sum(n_i t_i)}{\sum n_i}$$

Donde T= tiempo promedio de la germinación, t_i = número de días después de la siembra, n_i = numero de semillas germinadas el día i .

Índice de germinación. Scott *et al* (1984), utiliza la misma fórmula que en el caso anterior pero lo relaciona con el numero de semillas sembradas.

$$IG = \frac{\sum(n_i t_i)}{N}$$

Donde IG = índice de germinación, n_i = numero de semillas germinadas el día i , t_i = número de días después de la siembra, N= total de semillas sembradas.

Dicha fórmula provee una medida del tiempo de germinación en relación con la capacidad de germinación y no proporciona información acerca de la distribución de los eventos de la germinación en el tiempo. Si se compara la información que da el coeficiente de velocidad refleja más velocidad en sentido estricto que el índice de germinación, que es más sensible a los cambios en la capacidad de germinación. (González-Zertuche y Orozco-Segovia, 1996)

Existen índices que intentan relacionar la capacidad de germinación con el tiempo de germinación, algunos son:

Índice de Abbot. Expresa la germinación en función del tiempo con coeficientes (Abbot, 1955).

Velocidad de germinación. Relación del número de semillas germinadas con el tiempo de germinación (Maguire, 1962)

Coefficiente de Timson. Es la sumatoria del número de semillas germinadas a diario, inversamente relacionado con el tiempo desde el inicio de la siembra (Timson, 1965).

Valor de germinación. Es el producto del porcentaje de germinación acumulada en el punto de inflexión de la curva, por la medida del número de semillas germinadas cada día (Czabator, 1962).

Estos índices son poco recomendados ya que se puede dar el mismo valor a dos poblaciones con comportamiento diferente, por ejemplo, el índice de Timson podría dar el mismo valor a una población que germina el 90% el primer día y 10% el decimo, que a una población que no germina en los primeros 9 días pero germina el 100% el decimo día (González-Zertuche y Orozco-Segovia, 1996). Se considera que el valor de Timson solo sería un buen parámetro si todas las muestras expresaran la misma capacidad germinativa (Goodchild y Walker, 1971). Sin embargo, si existen diferencias en el porcentaje de germinación diaria, estas se enmascaran en el valor del índice, por lo que su aplicación no puede ser universal (Jassen, 1973). Además curvas similares que difieren en el tiempo de inicio de la germinación no se pueden diferenciar por este índice (Naylor, 1981).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal y Establecimiento de Experimentos

Se evaluaron dos especies de maguey con importancia económica e histórica, por ser empleadas para elaboración de bebidas embriagantes, *A. mapisaga* y *A. angustifolia* subsp. *tequilana*. Las capsulas de *A. mapisaga* se recolectaron en su ambiente propio, para el caso de *A. angustifolia* subsp. *tequilana*, las semillas proceden de plantas que crecieron en el Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Estas se llevaron al laboratorio para separar las semillas de los frutos totalmente maduros y deshidratados, las capsulas fueron cosechadas en madurez fisiológica.

Las semillas se sembraron en cajas de petri esterilizadas en autoclave. En cada caja se colocó una capa de algodón y sobre éste un papel filtro. Todo este sustrato se humedeció con agua destilada hasta su saturación. Las semillas se colocaron sobre papel filtro humedecido y se cubrieron con papel absorbente, posteriormente se colocó la tapa de la caja de petri. En cada caja se colocaron 20 semillas, lo que constituyó una unidad experimental que se repitió cinco veces. Las cajas con las semillas se colocaron en temperaturas de 15, 20, 25, 30, 35 y 40°C, en una cámara de germinación (Lumistell ICP- 19 d-c/iv). Durante el desarrollo del experimento se mantuvo la humedad en cada una de las cajas con la adición de agua destilada

Medición de la Imbibición y de la Germinación

Los parámetros de germinación fueron evaluados según el método aprobado por la Association of Official Seed Analysis (AOSA, 1983), modificado por Peña-Valdivia *et al.* (2002), a las temperaturas constantes de 15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C. Los datos se tomaron cada 24 h durante 30 días. Al final de este periodo las semillas que presentaron contaminación fueron abiertas para constatar su inviabilidad.

Las semillas se consideraron germinadas cuando la radícula emergió de la testa aproximadamente de 4 a 5 mm, tal como se muestra en la figura 1.



Figura 1. Semillas germinadas de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* (superior) y de *A. mapisaga* (inferior).

La imbibición se registró como ganancia de peso de cada semilla (a causa de la absorción de agua) con respecto a su peso inicial. Se realizaron lecturas del peso de las semillas a diferentes intervalos de tiempo (cada 6 h el primer día, 12 h el segundo día y 24 h durante 30 días), expresando los resultados en porcentaje de peso aumentado respecto al peso inicial de la semilla.

Prueba Bioquímica de Viabilidad (Prueba por Tetrazolio).

El método se realizó en un laboratorio de la Facultad de Agronomía de la UASLP. Se utilizó 2, 3,5- trifenil tetrazolio en una solución al 1% como reactivo para verificar la viabilidad. Se utilizaron trescientas semillas de cada especie, las cuales se embebieron durante 24 h en agua destilada antes de colocarse en la solución de tetrazolio. Después de ser embebidas, para su preparación solo fue requerida una incisión con bisturí paralela al eje hipocótilo, esto para facilitar la entrada de la solución a la semilla.

La unidad de observación se constituyó por un grupo de 25 semillas, y se prepararon doce grupos. Las semillas de cada grupo se colocaron en un vaso de

precipitado con 50 ml de solución de tetrazolio. Cada vaso se tapó y envolvió con papel aluminio para mantener las semillas en total oscuridad, las cuales se dejaron reposar a 25 °C. La observación de las semillas, luego de la acción de la solución se realizó en tres tiempos: a los 24, 48 y 72 h. En cada tiempo se analizaron cuatro grupos de 25 semillas cada uno, es decir, cuatro repeticiones para cada especie.

La observación se realizó de la siguiente manera: cada semilla se diseco con un bisturí y se observó con un microscopio estereoscópico (marca MOTIC, modelo MAIN). La viabilidad del embrión se definió con base en el patrón de tinción. El criterio fue que un embrión se consideró viable cuando 2/3 partes del mismo se teñía la semilla, pero para el caso de aproximadamente el 90% de las semillas no se necesito criterio de evaluación ya que presentaban embrión totalmente teñido o embrión sin teñir.

La viabilidad se expreso en porcentaje mediante la siguiente fórmula:

$$Viabilidad = \frac{No. de semillas teñidas}{No. total de semillas} \times 100$$

Diseño Experimental y Análisis de Datos

Se utilizo un diseño experimental completamente aleatorio con cinco repeticiones de cada uno de los tratamientos. Los factores a evaluados fueron: especie (*Agave mapisaga* y *A. angustifolia* subsp. *tequilana*) y temperatura (15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C). Para analizar los datos de las variables porcentaje de germinación máxima, imbibición máxima, porcentaje de semillas viables, inviables y semillas muertas (sin embrión) se utilizo el análisis de la varianza (ANOVA). Las curvas de imbibición, germinación en el tiempo, las de respuesta a la temperatura se ajustaron con el programa Sigma Plot Jandel Scientific (Versión 7.1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Imbibición

Las semillas de las dos especies de *Agave* fueron permeables al el agua e incrementaron su peso por imbibición con todas las temperaturas evaluadas. Pero un aumento mayor sucedió en las temperaturas 30, 35 y 40 °C en ambas especies, al alcanzar porcentajes de imbibición mayores que 100% (Figura 2). Las temperaturas bajas, 25, 20 y 15 °C promovieron una imbibición de 100% o menor que.

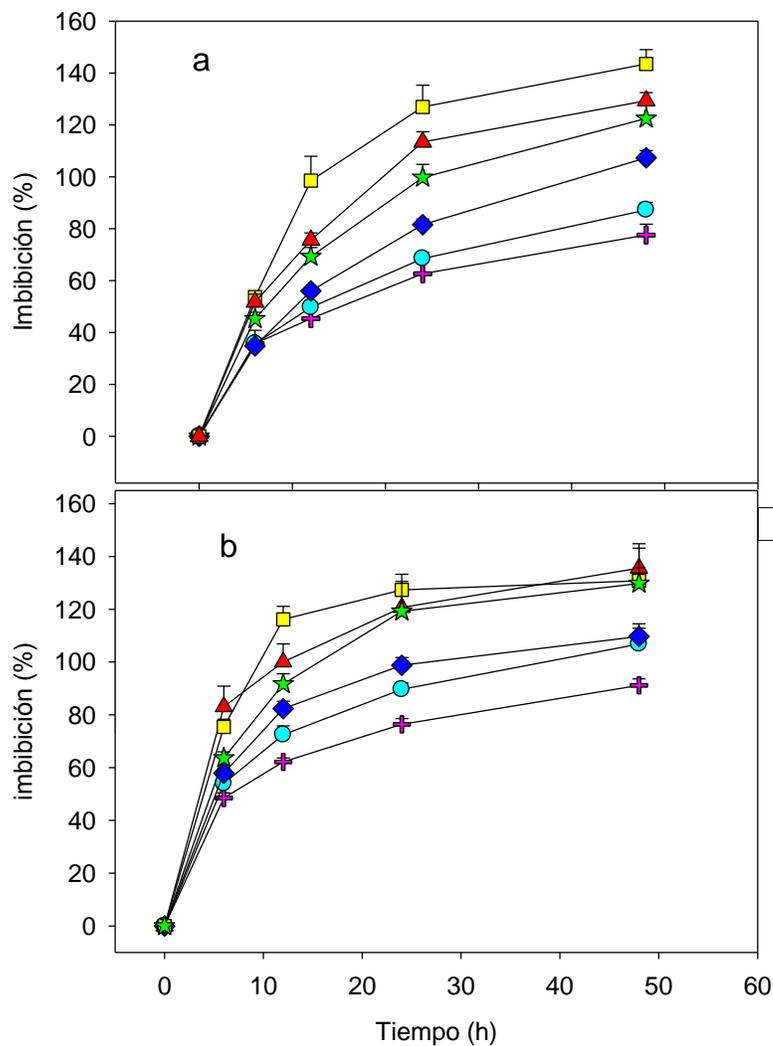


Figura 2. Dinámica de imbibición de las semillas a las primeras 48 horas, de *A. angustifolia* subsp. *Tequilana* (a) y *A. mapisaga* (b) (—+— 15, —●— 20, —◆— 25, —▲— 30, —■— 35 y —★— 40 °C). Las barras indican el error estándar, n= 5.

La fase de imbibición acelerada ocurrió durante las primeras 24 horas, en el caso de *A. angustifolia* subsp. *tequilana*, un aumento mayor que 100% ocurrió en las temperaturas 35 y 40 °C, oscilando su imbibición entre 113 y 126%. Para *A. mapisaga*, las temperaturas de 30, 35 y 40 °C promovieron una imbibición entre 119 y 127%, en el caso de las temperaturas bajas de esta especie, la imbibición osciló entre 76 y 98% de absorción. En cuanto a *A. angustifolia* subsp. *tequilana*, la imbibición con temperaturas bajas osciló entre 62 y 81%.

Imbibición Máxima por Temperatura

Las temperaturas elevadas favorecieron la imbibición de las semillas en ambas especies de *Agave*. Conforme la temperatura de germinación se incrementó, también lo hizo la cantidad de agua embebida, desde 160% en 15 y 20 °C, pasando por un promedio de 190% en 25, 30 y 35 °C, hasta alcanzar un 210% en 40 °C (Figura 3). La imbibición máxima en 40 °C fue estadísticamente mayor que la registrada en 15 °C.

La relación entre la tasa de imbibición y la temperatura fue documentada por Vertucci y Leopold (1987), y resulta del efecto de la viscosidad del agua sobre su difusión en la semilla. La viscosidad del agua se relaciona de manera inversa con la temperatura (Vertucci y Leopold, 1983). Lo que señalan Vertucci y Leopold permite sugerir que las temperaturas altas promovieron una acelerada imbibición (Figura 2) y una cantidad mayor de agua absorbida por las semillas (Figura 3).

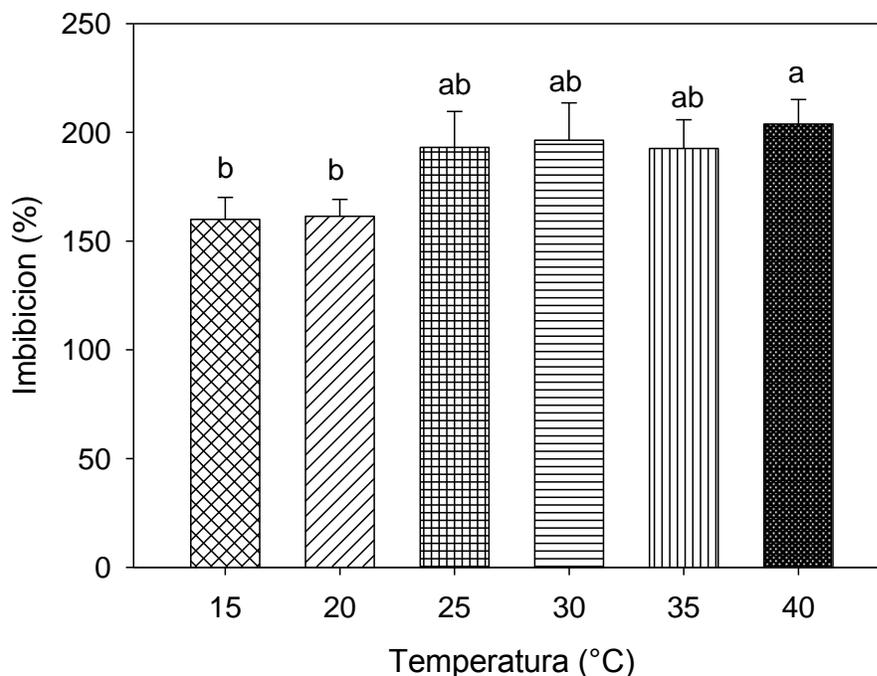


Figura 3. Imbibición promedio de *A. mapisaga* y *A. angustifolia* subsp. *tequilana*, en temperaturas de 15 a 40 °C respectivamente. Letras distintas en cada una de las barras indican diferencias estadísticas entre temperaturas, según la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$.

Imbibición Promedio por Especie

Las semillas de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* embebieron un promedio de 213%, una cantidad estadísticamente mayor que el 156% registrado en las de *A. mapisaga*. La semilla de las dos especies estudiadas en esta investigación tienen tamaños distintos, la de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* es mayor que la de *A. mapisaga*. Así, la diferencia de imbibición por especie podría explicarse en parte por su tamaño (Figura 5).

Al respecto, Kikusawa y Koyama (1999) señalan que la cantidad de agua necesaria para germinar es directamente proporcional a la masa de la semilla. No obstante, también que la tasa de imbibición puede ser atribuida a características de la testa (Pascualides y Planchuelo, 2007; Nonogaki *et al.*, 2007) y al grosor del endospermo más que al tamaño de la semilla.

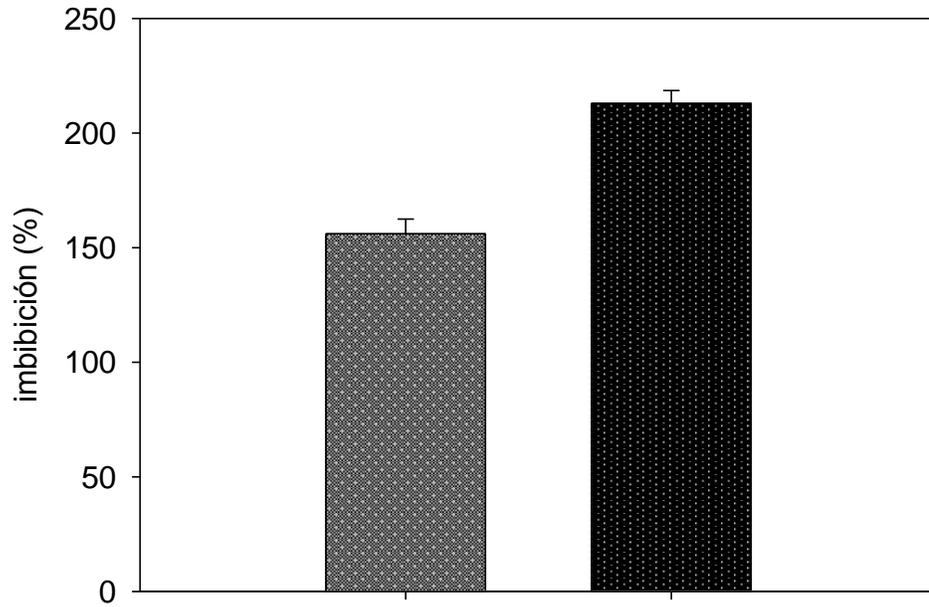


Figura 4. Diferencia en porcentaje de la imbibición promedio que tubo cada especie  *A. mapisaga* y  *A. angustifolia subsp. tequilana*. Las barras indican el error estándar.

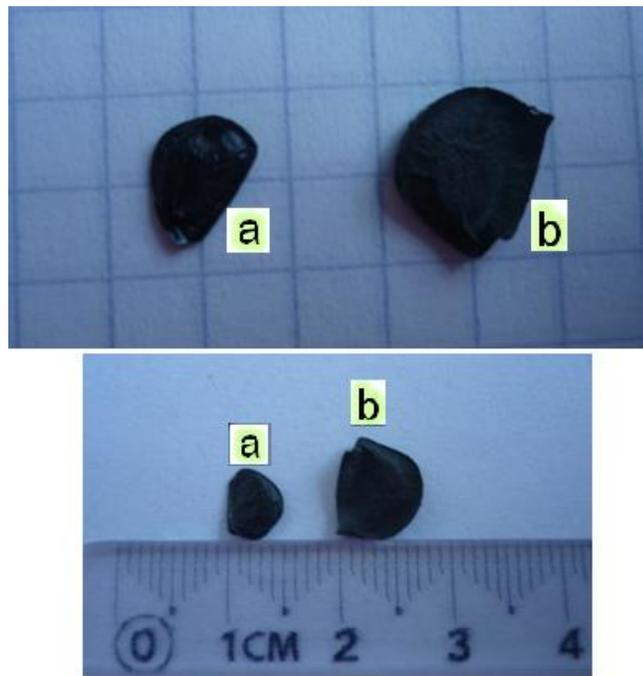


Figura 5. Diferencia en tamaño de semillas entre las dos especies estudiadas a) *A. mapisaga*, b) *A. angustifolia subsp. Tequilana*.

Dinámica de Germinación en el Tiempo

La germinación inició primero en *A. mapisaga* y después en *A. angustifolia* subsp. *tequilana*, en la primera a los cinco días y en la segunda a los 7 días. Las temperaturas de 25 y 30 °C promovieron una velocidad de germinación más rápida en ambas especies, aunque con algunas diferencias. En *A. mapisaga* la máxima germinación se alcanzó en 10 días y en *A. angustifolia* subsp. *tequilana* en 15 días o más. Otra diferencia notable fue que la velocidad máxima de germinación en *A. mapisaga* se registró en 25 y 30 °C y en *A. angustifolia* subsp. *tequilana* en 30 °C. Las temperaturas 20 y 35 °C redujeron el inicio de la germinación y su velocidad (Figura 6).

El patrón de germinación en relación con la temperatura observado en esta investigación coincide parcialmente con lo registrado por Ramírez-Tobías *et al.* (2012), quienes señalaron que la temperatura óptima para la germinación de siete especies de *Agave* se encuentra en 25 °C o alrededor de este valor. Los mismos autores señalan que la temperatura óptima para la germinación de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* es 30 °C.

Esto sugiere que la germinación de esta especie, en forma natural, ocurre en temperaturas cálidas.

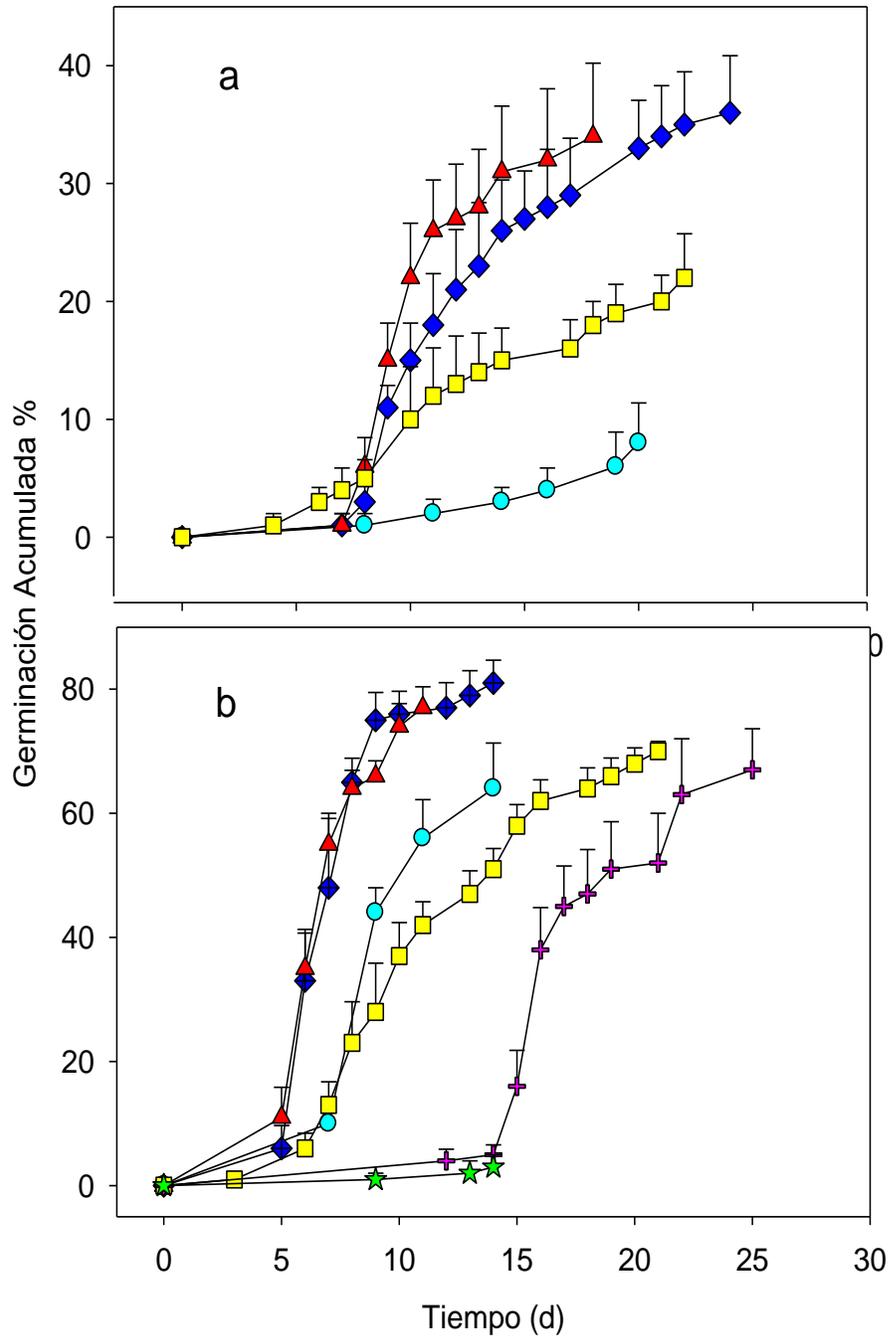


Figura 6. Efecto de la temperatura sobre la germinación acumulada en semillas de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* (a) y *A. mapisaga* (b). Las barras indican el error estándar. (+ 15, ● 20, ◆ 25, ▲ 30, ■ 35 y ★ 40 °C).

Valor Máximo de la Germinación Acumulada

La germinación alcanzada durante los 30 días que duró esta investigación fue estadísticamente mayor en *A. mapisaga* que en *A. angustifolia* subsp. *tequilana*. En *A. mapisaga* se encontró similitud estadística de la germinación entre las temperaturas de 15 a 35 °C, con un promedio aproximado de 70%. En contraste, la germinación de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* alcanzó un 26% en promedio, y en un intervalo de temperatura menor, de 25 a 35 °C, donde no existieron diferencias estadísticas. Este resultado manifiesta problemas en la reproducción sexual de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* que posiblemente se deban a endogamia debido a la supresión de la reproducción sexual por la práctica de retirar el escapo floral para la concentración de azúcares en la piña con el fin de producir tequila. Ambas especies han sido humanizadas (Vargas-Ponce *et al.*, 2007; Mora-López *et al.*, 2011), es posible que la carencia de germinación observada en *A. angustifolia* subsp. *tequilana* sea debida a una mayor intensidad en su manejo.

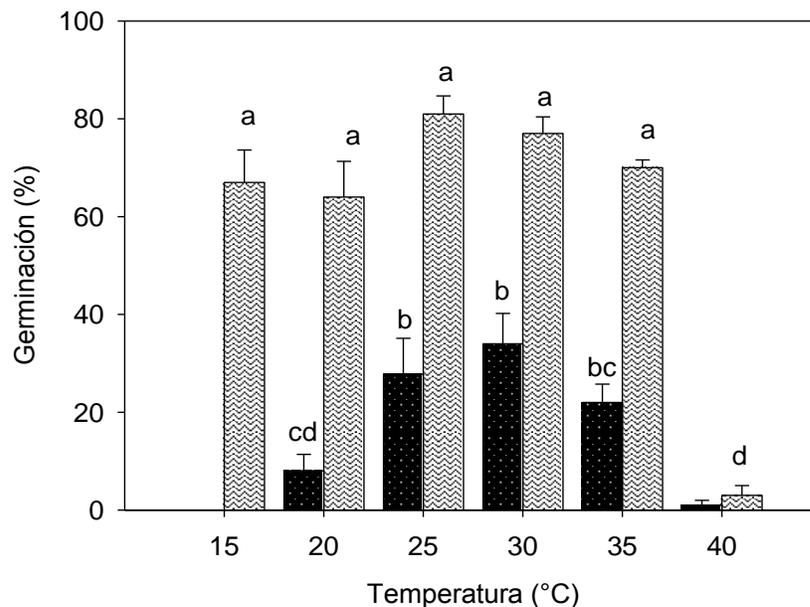


Figura 7. Germinación máxima de dos especies de *Agave* en diferentes temperaturas. Las letras distintas en cada una de las barras indican diferencias estadísticas entre temperaturas, según la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$. *A. mapisaga*  y *A. angustifolia* subsp. *tequilana* .

Viabilidad

La viabilidad se registró a las 24, 48 y 72 horas, aunque de acuerdo con los resultados no dependió del tiempo, pero sí de la especie. La especie que presentó mayor proporción de embriones viables fue *A. mapisaga* con un promedio del 68% contra *A. angustifolia* subsp. *tequilana* con un promedio de 19% (Figura 10). En *A. mapisaga* se encontró un 31% de semillas con embrión inviable y poco más de un 1% de semillas carentes de embrión. Por el contrario, las semillas de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* presentaron embriones inviables en un 53%, y un 28% carecieron de embrión.

El porcentaje germinación de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* encontrado (Figuras 9) es bajo (alrededor de 30%) en comparación con otras especies de *Agave* (80% o mayor), como se observó al compararlo con *A. mapisaga* en esta investigación, y como lo registraron Ramírez-Tobías *et al.* (2012) al compararlo con otras 7 especies.

Aproximadamente una tercera parte de las semillas de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* germinaron, otra tercera parte carecieron de embrión o endospermo y la tercera parte restante presentaron embriones inviables. Escobar-Guzmán *et al.* (2008) confirmaron la presencia de granos de polen que desarrollan tubo polínico anormal en *A. angustifolia* subsp. *tequilana*. Se sugiere que estos granos de polen pudieran fertilizar al ovulo dando lugar al desarrollo de la semilla, pero posteriormente abortar.

Es probable que la proporción de embriones inviables de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* que presentaron también procedan de la fertilización con tubos polínicos anormales y que esto represente condiciones de debilidad y en consecuencia mortalidad del embrión en el corto plazo (Escobar-Guzmán *et al.*, 2008). Estos resultados confirman la alerta sobre los problemas reproductivos de *A. angustifolia* subsp. *tequilana*, la especie de *Agave* con mayor importancia económica, cuyas semillas sin embrión e inviables sumaron el valor más alto de 81% contra las semillas viables las cuales solo fueron de un 19%. En contraste, las semillas viables de *A. mapisaga* fueron un 70%.

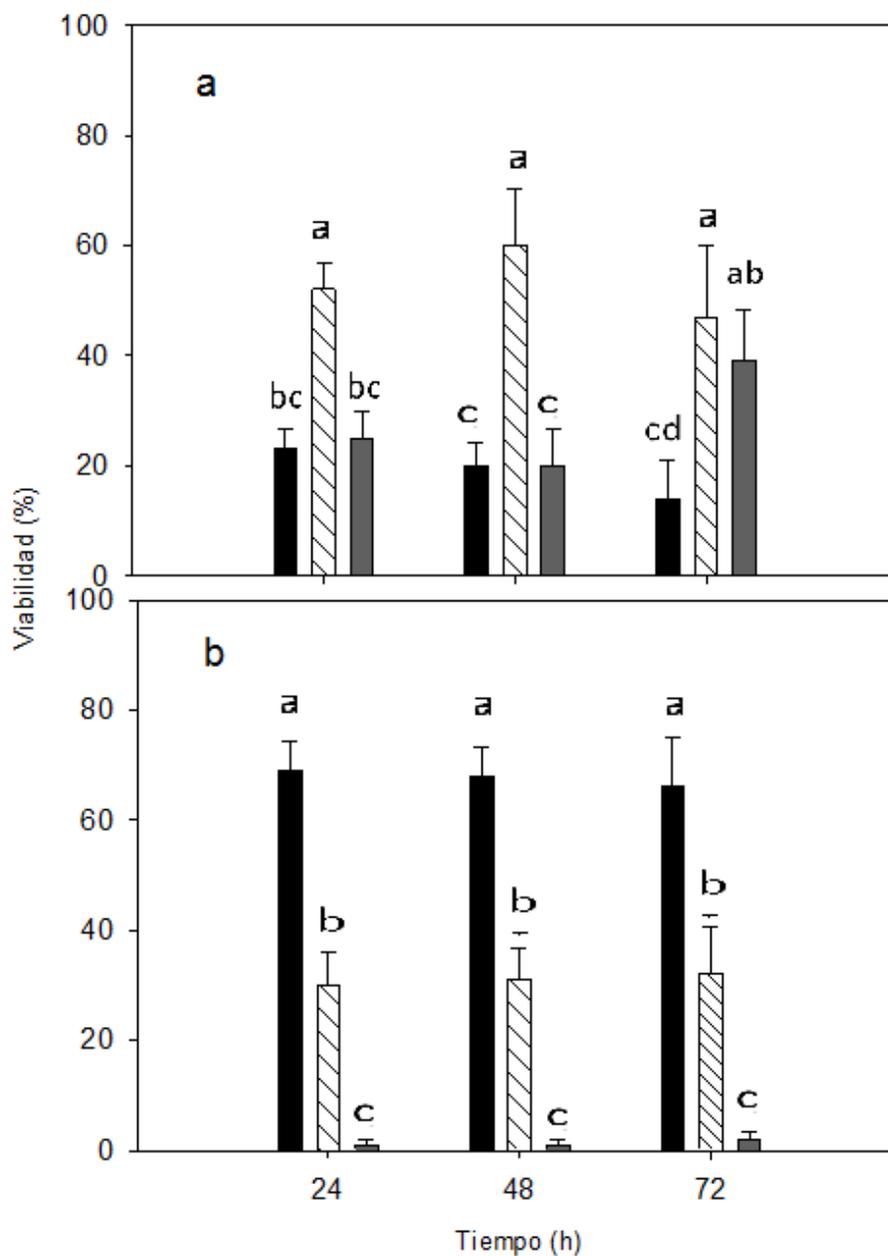


Figura 8. La figura muestra la viabilidad que se registro a diferentes horas, donde se encontraron semillas viables, inviables y sin embrión. *A. angustifolia* subsp. *tequilana* (a) y *A. mapisaga* (b). Las barras de dispersión significan un error estándar y las literales en cada media señalan diferencias estadísticas según la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$, $n=5$.

El mayor porcentaje de semillas sin embrión se obtuvieron en la especie de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* con un porcentaje de 28% y *A. mapisaga* solo obtuvo un 1.3 % de este tipo de semillas (Figura 8). Escobar-Guzmán et al. (2008) escarificaron semillas de *Agave tequilana* y *A. americana*, observaron que una proporción elevada de la primera no contenía embrión y/o endospermo (figura 9). La elevada proporción de semillas sin embrión o endospermo de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* confirmada por esta investigación explica, en parte, la baja germinación registrada por esta especie.

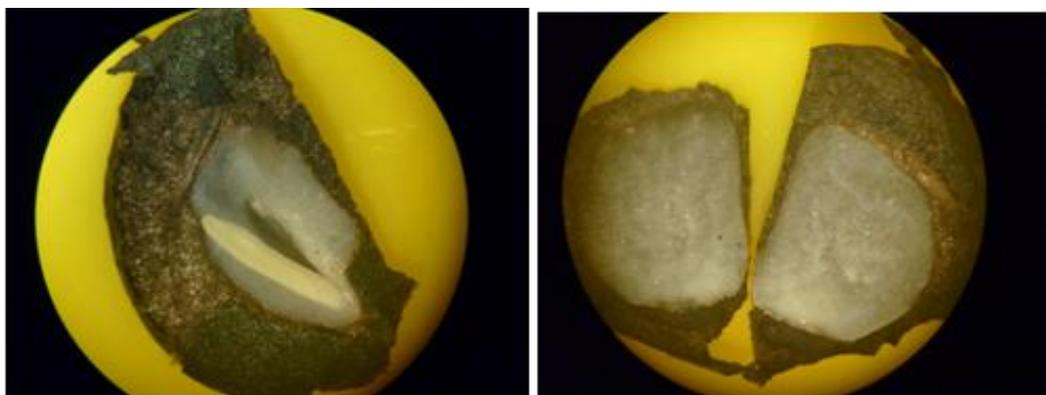


Figura 9. Comparación de semillas de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* , semilla normal con embrión (izquierda) y sin embrión (derecha).

Escobar-Guzmán *et al.* (2008) registro que la producción de semillas y la eficiencia de germinación para *A. angustifolia* subsp. *tequilana* fue muy baja, en diferentes tratamientos de polinización que realizo en su investigación, aunque la cruce de polinización con *A. americana* produjo algunas semillas viables.

CONCLUSIONES

Las semillas de las dos especies fueron permeables y presentaron las fases típicas de la imbibición, su velocidad de imbibición fue estimulada por las diferentes temperaturas, pero con tasas diferentes entre especies. En cuanto a germinación se refiere en el caso de *A. mapisaga* la temperatura óptima de germinación fue de 25 °C, y para *A. angustifolia* subsp. *tequilana* fue en la temperatura de 30 °C.

Para el caso de *A. angustifolia* subsp. *tequilana* se confirmaron investigaciones acerca de su baja capacidad germinativa, lo cual se explica por la proporción elevada (2/3) de semillas inviables y semillas con ausencia de embrión y/o endospermo. Los resultados obtenidos sugieren incompatibilidad genética por causa de los efectos de la endogamia y sus factores que afectan el desarrollo del polen (parteaguas para la formación del fruto), o de factores aberrantes en el desarrollo del gametofito femenino que pueden estar relacionados con la baja fertilidad observada para esta especie.

Agave mapisaga presentó valores de germinación similares a otras especies de *Agave*. A pesar de ser una especie altamente humanizada, este hecho no ha influido en su capacidad de germinación

LITERATURA CITADA

Abbot D.L. 1955. Temperature and the dormancy of apple seeds. XIVth International Horticulture Congress. La Haye-Scheveningen I:746-753

Aguirre R.J.R.; H Charcas Z.; J.L. Flores F. 2001. El maguey mezcalero potosino. COPOCYT-UASLP. San Luis Potosí., S.L.P. México. 87 p.

AOSA. 1983. Sedd vigor testing handbook. Contribution No. 32. Association of Official Seed Analysis

Ayón-peña, Y. 2007. Estudio etnofarmacológico de las diferentes especies endémicas de agave en la medicina tradicional del estado de hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias de la Salud, Área Académica de Farmacia. P. 79.

Baskin, C.C and J.M. Baskin. 1988. Germination ecophysiology of herbaceous plant species in a temperate region. American Journal of Botany. 75: 286-305.

Bewley, J.D y Black, M. 1994. Seeds. Physiology of development and germination. 2a edición. Plenum. New York. EU. 445 p.

Colunga-García Marín, P.; E. Estrada-Loera y F. May-Pat. 1996. Patterns of morphological variation, diversity, and domestication of wild and cultivated populations of *Agave* in Yucatan, Mexico. American Journal of Botany 83:1069-1082.

Cóme, D. 1968. Problemes of terminologie poses par la germination et ses obstacles. Bulletin Societe Francaise Physiologie Vegetale. 14: 3-9.

Consejo Regulador del Tequila (2013). <http://www.crt.org.mx/> (consultado el 1 de agosto del 2013)

Czabator, F.J. 1962. Germination index: an index combinig speed and completeness of pine seed germination. Forest Science. 8: 386 - 396

Diario Oficial de la Federación. 1993. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1993, Bebidas Alcohólicas-Tequila-Especificaciones, México. D.F. Octubre, 13: 48-52.

Escobar-Guzmán, R.E.; Hernández, F.Z.; Vega K.G. y J. Simpson, 2008 Seed production and gametophyte formation in *Agave tequilana* and *Agave americana*. Irapuato, Guanajuato, Mexico. *Botany*, 86(11): 1343-1353, 10.1139/B08-099

Freeman, C.E.; R.S. Tiffany y W.H. Reid. 1977. Germination responses of *Agave lechuguilla*, *A. parryi*, and *Fouqueria splendens*. *The Southwestern Naturalist*. 22: 195-204.

García-Herrera, E. J.; Méndez-Gallegos, S. de Jesús y Talavera-Magaña, Daniel. 2010. El género agave spp. En México: principales usos de importancia Socioeconómica y agroecológica. *RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición, Edición Especial No. 5*

Gentry, H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona. 670 p.

Gonzales-Zertuche, L y Orozco-Segovia, A. 1996. Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. Mexico 58: 15-30.

Goodchild, H.A. y Walker M.G. 1971. A method of measuring germination in physiological studies. *Annals of Botany*. 35: 615 - 621

Gordon, A.G. 1971. The germination resistance test- a new test for measuring germination quality of cereals. *Canadian Journal of Plant Science*. 51: 181-183.

Granados, D. 1993 “Los Agaves En México”, Universidad Autónoma De Chapingo. Mexico. 252 p.

Harrington, J.F. 1962. The effect of temperature on the germination of several kinds of vegetable seeds. XVth International Horticulture Congress. Bruxelles. II: 435-441.

Heydecker, W. 1973. Seed ecology. Proc 19th Easter School in Agriculture Science University of Nottingham. London. 578 p

Hilhorst, H.W.M. 1998. The regulation of secondary dormancy: The membrane hypothesis revised. *Seed Science Research*. 8: 77-90.

Janssen J.G.M. 1973. A method of recording germination curves. *Annals of Botany*. 37: 705 – 708.

Kihachiro Kikuzawa y Hiromasa Koyama. 1999. Scaling of soil water absorption by seeds: an experiment using seed analogues. *Seed Science Research*. 9:171-178

Kotowsky, W. 1926. Temperature relations to germination of vegetables seed. *Proceedings American Society Horticulture Science* 23: 176-184.

Labrada R, 2005. Manejo de malezas para países en desarrollo. Addendum 1, Estudio FAO Produccion y Proteccion Vegetal. 403 p.

Maguire, J.D. 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*. 2: 176 – 177.

Mora-López, J. L.; Reyes-Agüero, J. A.; Flores-Flores, J. L.; Peña-Valdivia, C. B. y Aguirre-Rivera, J. R. 2011. Variación morfológica y humanización de la sección *salmianae* del género *Agave*. *Agrociencia* 45: 465-477

Naylor, R.E.L. 1981. An evaluation of various germination indices for predicting differences in seeds vigour in Italian ryegrass. *Seed Science y Technology*. 9: 593 – 600.

Nonogaki, H.; F. Chen y K.J. Bradford. 2007. Mechanisms and genes involved in germination *sensu stricto*. In: K.J. Bradford; H. Nonogaki (Eds). *Seed development, dormancy and germination*. Blackwell Publishing Ltd. Ames, Iowa. EU. pp: 264-304.

Pascualides, A.L. y A.M. Planchuelo. 2007. Seed morphology and imbibition pattern of *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae). *Seed Science & Technology*. 35: 760-764.

Peña-Valdivia, C.B.; R. García N.; J.R. Aguirre R.; C. Trejo L. 2002. The effects of high temperature on dormancy and hypocotyl-root growth of wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Seed Science & Technology*. 30: 231-248.

Peña-Valdivia, C.B.; Sánchez-Urdaneta, A.B.; Aguirre R, J.R.; Trejo, C.; Cárdenas, E. y Villegas M, A. 2006. Temperature and mechanical scarification on seed germination of `maguey´ (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Seed Science & Technology*. 34: 47-56.

Perez, E.B; Villavicencio, N.M y Ramírez A.A. 2003. Lista de las plantas útiles del estado de hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Centro de investigaciones biológicas. México. P 7, 10,21, 53 y 54.

Peters, J., ed. 2000. Terazolium Testing Hand Book. Contribution No. 29 to the Hand Book On Seed Testin. AOSA.

Piven, N.F., Barredo-Pool, I., Borges-Argaéz, M., Herrera- Alamillo, A., Mayo-Mosqueda, J., Herrera-Herrera, J.L., and Robert, M. 2001. Reproductive biology of Henequen (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave angustifolia* (Agavaceae). I. Gametophyte development. *Am. J. Bot.* 88: 1966– 1976. doi:10.2307/3558424.

Pritchard, H.W.; A.P. Miller. 1995. The effects of constant temperatures, light and seed quality on the germination characteristics of *Agave americana*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 57: 11-14.

Probert, R.J. 2000. The role of temperatura in the regulation of the seed dormancy and germination. In: M. Fenner (Ed). *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities.* 2a. edición. CABI Publishing. NY. EU. pp: 261-292.

Ramírez Tobías, H.M. 2010. Características bioquímico-fisiológicas de la germinación y desarrollo de plantas jóvenes de maguey (*Agave*) y su relación con la especie, temperatura y potencial de agua del sustrato. Colegio de postgraduados. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas.

Ramírez-Tobías, H.M.; Peña-Valdivia, C.B.; Aguirre R, J. R.; Reyes-Agüero J. A.; Sánchez-Urdaneta, A.B. y Salvador Valle G. 2012. Seed germination temperatures of eight Mexican *Agave* species with economic importance. *Plant Species Biology.* 27:124–137

Rendón Garcini, R. 1990. Dos haciendas pulqueras en Tlaxcala, 1857-1884. Universidad Iberoamericana, Departamento de historia. México. 236 P.

Scott, S.J; Jones, R.A y Williams, W.A. 1984. Review of data analysis methods for seed germination. *Crop Science* 24:1129-1199.

Simón-Martínez E. y Moysset Agust L. 2006. Prácticas de crecimiento y desarrollo de los vegetales. Edicions Universitat Barcelona. 96 P.

Timson, J. 1965. A new method of recording germination data. *Nature* 207, 216 - 217

Valenzuela-Zapata, A.G; G.P. Nabhan. 2003. Tequila: a natural and cultural history. The University of Arizona Press. Tucson. Arizona. EU. 114 p.

Vargas-Ponce, O.; D. Zizumbo-Villarreal; P. Colunga-GarcíaMarín. 2007. In situ diversity and maintenance of traditional *Agave* landraces used in spirits production in west-central Mexico. *Economic botany.* 61: 362-375.

Vertucci, C.W.; A.C. Leopold. 1983. Dynamics of imbibition by soybean embryos. *Plant Physiology*. 72: 190-193.

Vertucci, C.W.; A.C. Leopold. 1987. Water Binding in Legume Seeds. *Plant Physiology*. 85: 224-231.

Wilson, T.B.; E.T.F. Witkowski. 1998. Water requirements for germination and early seedling establishment in four african savanna woody plant species. *Journal of Arid Environments*. 38: 541-550.