



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE SONORA**  
Departamento de Biotecnología y Ciencias Alimentarias.

---

---

**“Establecimiento *in vitro* de explantes de maguey  
mezcalero (*Agave angustifolia* Haw)”**

**TITULACIÓN POR TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERA BIOTECNÓLOGA**

**PRESENTA**

**MAYRA XITLALIC RAMÍREZ VILLALOBOS**

**CD. OBREGÓN, SONORA**

**MAYO DE 2007**

---

---

**ÍNDICE GENERAL**

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	vi
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	viii
<b>RESUMEN</b>	x
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA</b>	7
2.1 Generalidades.	7
Historia del agave en México.	7
2.2 Descripción botánica del <i>Agave angustifolia</i> Haw.	10
2.2.1 Clasificación taxonómica.	10
2.2.2 Anatomía del <i>Agave angustifolia</i> Haw.	10
2.2.3 Metabolismo ácido de crasuláceas.	11
2.2.4 Importancia ecológica de la fijación nocturna de CO <sub>2</sub> por plantas MAC.	12

---

2.2.5 Principales requerimientos físicos y de nutrición.	12
2.2.5.1 Temperatura.	12
2.2.5.2 Fluctuación fotosintética.	13
2.2.5.3 Nutrición.	13
2.2.6 Tipo de reproducción.	14
2.2.7 Distribución geográfica.	14
2.2.8 Cultivo y manejo del <i>Agave angustifolia</i> .	16
2.2.9 Establecimiento y Manejo.	17
2.2.10 Usos.	18
2.3 Micopropagación vegetativa por cultivo de tejido <i>in vitro</i>	19
2.3.1 Definición e Importancia.	19
2.3.2 Condiciones <i>in vitro</i> en las Cactáceas y el género Agave.	20
2.4 Fases de la micropropagación <i>in vitro</i> .	21
2.4.1 Fase 1. Establecimiento del explante de los cultivos axénicos.	21
2.4.2 Fase 2. Multiplicación del tejido.	21
2.4.3 Fase 3. Elongación y enraizamiento.	22
2.4.4 Fase 4. Adaptación.	22
2.5 Técnicas de esterilización y manipulaciones asépticas.	23
2.5.1 Importancia de las condiciones de esterilidad.	23
2.5.2 Agentes químicos utilizados en el control de organismos patógenos.	24
2.5.3 Oxidación en el cultivo <i>in vitro</i> .	25
2.5.4 Heridas y estímulos mecánicos en hojas.	26
2.6 Medios de cultivo <i>in vitro</i> de los tejidos vegetales.	27

---

2.6.1 Medio de cultivo.	27
2.6.2 Agua.	28
2.6.3 Agar.	28
2.6.4 Fuentes de carbono.	28
2.6.5 Vitaminas y otros elementos orgánicos.	28
2.6.6 Complejos orgánicos.	29
2.6.7 Nutrición mineral.	29
2.6.8 Macronutrientes.	30
2.6.9 Micronutrientes.	31
2.7 Reguladores <i>in vitro</i> .	32
2.7.1 Reguladores de crecimiento.	32
2.7.2 Auxinas.	32
2.7.3 Citocininas.	33
2.7.4 Giberelinas.	33
2.7.5 Ácido abscísico.	33
2.8 Propagación masiva vía Células callosas.	34
2.8.1 Embriogénesis somática.	34
2.8.2 Organogénesis.	36
2.9 Cultivo de tejidos en agave.	36
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>38</b>
3.1 Preparación del medio de cultivo.	38
3.2 Preparación de soluciones desinfectantes hipoclorito de sodio (NaClO),	

---

fungicida y bactericida.	39
3.3 Preparación de antioxidantes.	40
3.4 Experimento I. Establecimiento aséptico de cultivos	41
Tratamientos de desinfección superficial del material vegetal.	42
3.5 Experimento II. Inducción de células callosas de <i>Agave angustifolia</i> Haw, utilizando dosis de 2,4-D (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l), y BA (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l).	46
3.6 Experimento III. Inducción de células callosas de <i>Agave angustifolia</i> Haw, utilizando dosis de 2,4-D (0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/l), y BA (0.0, 0.25, 0.75, 1.0 mg/l).	48
3.7 Experimento IV. Inducción de organogénesis sobre tejillo calloso del <i>Agave angustifolia</i> Haw.	50
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	52
4.1 Experimento I. Establecimiento aséptico de cultivos.	52
4.2 Experimento II. Inducción de células callosas de <i>Agave angustifolia</i> Haw, utilizando dosis de 2,4-D (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l), y BA (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l).	55
4.3 Experimento III. Inducción de células callosas de <i>Agave angustifolia</i> Haw, utilizando dosis de 2,4-D (0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/l), y BA (0.0, 0.25, 0.75, 1.0 mg/l).	57
4.4 Experimento IV. Inducción de organogénesis en tejido calloso de <i>Agave angustifolia</i> Haw.	58

---

**CONCLUSIONES**

62

**BIBLIOGRAFÍA**

63

**ANEXOS**

68

**ABREVIATURAS Y GLOSARIO**

76

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Agave laughing</i> .	8
<b>Figura 2.</b> <i>Agave tequilana</i> .	9
<b>Figura 3.</b> Anatomía del agave.	11
<b>Figura 4.</b> Distribución Geográfica del <i>Agave angustifolia Haw</i> .	15
<b>Figura 5.</b> Proceso de la embriogénesis somática.	35
<b>Figura 6.</b> Porcentajes de contaminación y oxidación entre tratamientos, sobre el tejido de hoja <i>Agave angustifolia Haw</i> , en el periodo de un mes (primer ensayo). ITSON 2005-2006.	53
<b>Figura 7.</b> Porcentajes de contaminación y oxidación entre tratamientos, sobre el tejido de hoja <i>Agave angustifolia Haw</i> , en el periodo de un mes (segundo ensayo). ITSON 2005-2006.	53
<b>Figura 8.</b> Porcentajes de contaminación y oxidación entre tratamientos, sobre el tejido de hoja <i>Agave angustifolia Haw</i> , en el periodo de un mes (tercer ensayo). ITSON 2005-2006.	54
<b>Figura 9.</b> Inducción de callo a partir de hojas de plantas de <i>Agave angustifolia Haw</i> . Tratamiento 7 (a), tratamiento 3 (b), tratamiento 2 (c), y tratamiento 14	

---

(d). ITSON 2005-2006.	56
<b>Figura 10.</b> Inducción de callo a partir de hojas de plantas de <i>Agave angustifolia</i> Haw. Tratamiento 7 (a), tratamiento 9(b), tratamiento 15 (c) y tratamiento 25 (d).ITSON 2005-2006.	58
<b>Figura 11.</b> Inducción de organogénesis sobre tejido caloso de <i>Agave angustifolia</i> Haw. ITSON 2005-2006.	59
<b>Figura 12.</b> Organogénesis <i>in vitro</i> de <i>Agave angustifolia</i> Haw. De los 5 tratamientos: (a) 10 mg/l BA, (b) 0 mg/l BA, (c) 2.5 mg/l BA, (d) 7.5 mg/l BA y (e) 5 mg/l BA. Todas muestran estructuras globulares verdes (nódulos) y la figura (a) muestra raíces (rizogénesis). ITSON 2005-2006.	60
<b>Figura 13.</b> Organogénesis <i>in vitro</i> de <i>Agave angustifolia</i> Haw. Formación de raíces (r) rizogénesis (a); Formación de estructuras globulares verdes (no) nódulos (b). ITSON 2005-2006.	61



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación Taxonómica de la especie <i>Agave angustifolia</i> Haw.	10
<b>Tabla 2.</b> Composición elemental de un tejido vegetal, expresado en porcentaje del peso seco correspondiente a cada elemento (Barcelo <i>et al.</i> , 1992. modificado).	30
<b>Tabla 3.</b> Reactivos, materiales y equipo.	40
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos de auxina y citocinina utilizados para la inducción de células callosas de <i>Agave angustifolia</i> Haw.	47
<b>Tabla 5.</b> Tratamientos de auxina y citocinina utilizados para la inducción de células callosas de <i>Agave angustifolia</i> Haw.	49
<b>Tabla 6.</b> Tratamientos utilizados para la inducción de organogénesis.	50
<b>Tabla 7.</b> Efecto del hipoclorito de sodio en dos tiempos de exposición, flutolanil (Moncut) y sulfato de gentamicina con clorhidrato de oxitetraciclina (Bactrol) en explantes de hoja de <i>Agave angustifolia</i> Haw.	69
<b>Tabla 8.</b> ANOVA. Efecto del diámetro de callo entre los tratamientos y las semanas en explantes de hoja de <i>Agave Angustifolia</i> Haw.	70
<b>Tabla 9.</b> Significancia al 0.05. Muestra las medias del factor A (diámetro de callo entre las semanas).	70

---

<b>Tabla 10.</b> Prueba de $t$ , con una significancia al 0.05. Muestra las medias del Factor B (diámetro de callo entre los tratamientos).	71
<b>Tabla 11.</b> ANOVA. Efecto del diámetro de callo entre los tratamientos y las semanas en explantes de hoja de <i>Agave Angustifolia Haw.</i>	72
<b>Tabla 12.</b> Prueba de $t$ , con una significancia al 0.05. Muestra las medias del factor A (diámetro de callo entre la semanas).	72
<b>Tabla 13.</b> Prueba de $t$ , con una significancia al 0.05. Muestra los promedios del diámetro de callo entre los tratamientos.	73
<b>Tabla 14.</b> ANOVA Efecto del diámetro de callo entre tratamientos y las semanas en explantes de hoja de <i>Agave Angustifolia Haw.</i>	74
<b>Tabla 15.</b> Prueba de $t$ , con un nivel de significancia al 0.05. Muestra las medias del Factor A (diámetro del callo entre las semanas), tratamientos (semanas).	74
<b>Tabla 16.</b> Prueba de $t$ , con un nivel de significancia al 0.05. Muestra las medias del Factor B (diámetro de callo entre los tratamientos).	75
<b>Tabla 17.</b> Prueba de $t$ , con un nivel de significancia al 0.05. Muestra las medias del Factor B (diámetro de callo entre los tratamientos), tratamientos (BA mg/l).	75

## RESUMEN

Se estableció un protocolo *in vitro* para la micropropagación del *Agave angustifolia* Haw. Se utilizaron hojas de plantas recolectadas en el campo y se desinfectaron, probando cuatro tratamientos diferentes: NaClO al 5% durante 25 minutos, NaClO al 5% durante 45 minutos, fungicida flutolanil (Moncut) 3 g/l, y antibiótico sulfato de gentamicina con clorhidrato de oxitetraciclina (Bactrol) 1 g/l. Las hojas se seccionaron en explantes de 1cm<sup>2</sup>, y éstos se sembraron en un medio de cultivo suplementado con tiamina-HCl, 1mg/l; mio-inositol, 100 mg/l; sacarosa, 30 gr/l; agar, 8 gr/l; bencilaminopurina (BA), 0.1 mg/l; ácido naftalenacético (ANA), 0.1 mg/l; ácido cítrico, 150 mg/l y ácido ascórbico, 100 mg/l. Las condiciones ambientales fueron 16/8 horas luz y temperatura de 25°C. En este experimento no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos.

En la inducción de callo a partir explantes de hojas, se desinfectaron los explantes con NaClO al 5%, durante 25 minutos y se siembra en el mismo medio de cultivo suplementado con la combinación de diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento ácido diclorofenolacético (2,4-D) (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l), y BA (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l). Las condiciones ambientales fueron 16/8 horas luz y temperatura de 25°C. Se obtienen resultados a la segunda semana de cultivo y muestran que existe diferencia altamente significativa para diámetro del callo entre las semanas y los tratamientos, se realizó la prueba *t*, con una significancia al 0.05. Se obtuvo mayor diámetro de callo con el tratamiento 14 con dosis de 1.5 mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de BA. Se realiza un nuevo experimento utilizando otras combinaciones de fitoreguladores 2,4-D (0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/l), y BA (0.0, 0.25, 0.75, 1.0 mg/l). Se obtienen resultados a la tercera semana de cultivo y

muestran que existe diferencia altamente significativa para diámetro del callo entre las semanas y los tratamientos, se realizó la prueba *t*, con una significancia al 0.05. Se obtuvo mayor diámetro de callo con el tratamiento 7 con dosis de 0.25 mg/l de 2,4-D y 0.25 mg/l de BA. Se registró un 100% de asepsia en estos dos experimentos. La organogénesis indirecta fue exitosa partir de tejido de callo mostrando estructuras globulares verdes (nódulos), y formación de raíces (proceso organogénico) en presencia de altas concentraciones de BA.

## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

El género agave que significa *noble* (del griego *agaue*), fue descrito por primera vez por el botánico sueco Carlos Von Linneo en 1753. Los agaves tienen hojas gruesas y puntiagudas que se despliegan del cogollo, el cual tiene hojas adheridas (Nobel, 1998).

A pesar de la diversidad e importancia etnobotánica y económica de muchas especies de agaves, sólo especies como *Agave tequilana*, *A. fourcoides* o *A. sisilana* se cultivan en forma extensiva utilizando variedades de propagación vegetativa (Malda y Ruiz, 2004).

La reproducción de *Agave angustifolia* en el Estado de Sonora es de forma natural y no se tiene un control de la cantidad anual producida, este tipo de plantas tiene un período de 1 a 3 años para poder producir hijuelos, estos hijuelos son transplantados a campo para que pasen entre 6 a 8 años para ser utilizados en la elaboración de bacanora.

El Bacanora es un destilado de agave, similar al tequila y mezcal diferenciándose por las características de la planta utilizada, por las condiciones climáticas imperantes en la región serrana de Sonora, el tipo de levaduras silvestres utilizadas y el proceso empleado para su elaboración. Posee características de sabor, aroma y cuerpo que lo diferencian y lo sitúan como una bebida ampliamente aceptada (CONACYT, 2003).

Un problema que requiere de atención inmediata es la disminución acelerada de las poblaciones silvestres del maguey *Agave angustifolia*, producto de la explotación inmoderada de este recurso. En ese sentido, distintas instituciones como la SEMARNAT, la Fundación Produce Sonora y la Secretaria de Desarrollo Económico y Productividad del Gobierno del Estado de Sonora, promueven la domesticación y la producción en plantaciones comerciales de maguey de bacanora, para respaldar la industria con materia prima segura y de buena calidad (CONACYT, 2003).

Otra estrategia para resolver la sobreexplotación del agave es usar la micropropagación para generar líneas clonales de plantas élite con biotipos de las diferentes áreas de la sierra sonorense. Esto permitirá la multiplicación rápida y eficiente de cultivares valiosos y la propagación de plantas libres de enfermedades, más vigorosas y de rápido crecimiento, lo cual podría incrementar significativamente la producción (CONACYT, 2003).

La micropropagación es ampliamente recomendada como una herramienta biotecnológica para estudiar y conservar especies amenazadas. Esta herramienta permite un rápido desarrollo de brotes en comparación con plántulas germinadas en invernadero (Ault y Blackmon, 1987 citado por Garcés, 2003), además de plántulas libres de patógenos, siendo también una buena alternativa para propagar especies que no producen brotes laterales (Clayton *et al.*, 1990, citado por Garcés, 2003).

Por otro lado, estudios realizados por Backhaus *et al.*, 1999, citado por Garcés, 2003, demuestran que las cactáceas sometidas a condiciones de cultivo *in vitro* pueden fijar CO<sub>2</sub> de manera continua, comportándose como plantas C3 facultativas, de lo que se deduce que el crecimiento de éstas puede ser acelerado a través del cultivo de tejidos *in vitro*.

Por tal motivo la necesidad de micropropagar plantas de agave, para reforestar zonas áridas y contribuir a la economía del Estado de Sonora, ya que este producto

---

se utiliza en la elaboración de bacanora, y como fibra textil en la fabricación de costales.

La micropropagación de *Agave angustifolia* es una alternativa del cultivo de tejidos vegetales, ya que se pueden obtener una cantidad amplia de plantas en cortos periodos de tiempos, estas plantas presentan una serie de ventajas ya que son libres de patógenos, se pueden obtener en cualquier periodo del año, y estas plantas tienen la capacidad de mantener las características genotípicas del material inicial seleccionado.

### **Justificación.**

En nuestra región, el bacanora es la bebida típica y su nombre no tiene relación con el producto en si, sino que lo toma de un poblado situado en la sierra Este de Sonora; además su origen está asociado a la cultura ópata que se desarrolló en esas regiones, la producción de bacanora representa una actividad productiva de gran importancia económica, cultural y social y podría generar una fuente de divisas, debido a que su producción puede ser exportada y es una fuente de empleo.

En la actualidad la utilización de agaves para la producción de bacanora, se ha visto afectada debido al tiempo de reproducción del agave siendo este periodo extenso (entre 1 y 3 años); además de lo anterior la planta de agave tiene un periodo entre 8 a 10 años para poder ser utilizado en la industria de bebidas alcohólicas tales como el bacanora.

Por este motivo se justifica la utilización de las herramientas de cultivo de tejidos vegetales, para disminuir su tiempo de generación, así como obtener plantas sanas libres de enfermedades o plagas y aumentar su producción, para su utilización por productores de bacanora, que actualmente dependen de lo que pueden recolectar en el campo y que se da en forma natural o silvestre y que amenaza con agotarse.

Esta investigación consistió en obtener la organogénesis indirecta a partir de donadores de explantes de hojas obtenidas de los jardines del ITSON unidad Obregón-Náinari, en Cd. Obregón, Sonora. Se utilizaron diferentes desinfectantes: hipoclorito de sodio al 5%, un funguicida y un antibiótico, para evaluar el de mejor efecto; también se evaluaron diferentes reguladores de crecimiento: ácido naftalenacético (AIA), 2-4 diclorofenoxiacético (2,4-D), y bencilaminopurina (BA), en diferentes concentraciones.

Distintas instituciones como la SEMARNAT, la Fundación Produce Sonora y la Secretaria de Desarrollo Económico y Productividad del Gobierno del Estado de Sonora, promueven la domesticación y la producción en plantaciones comerciales de maguey de bacanora. Así mismo la Norma Oficial Mexicana NOM-061-ECOL-1994 especifica que: “Las solicitudes para aprovechamiento de recursos forestales en terrenos que contengan especies de flora silvestre raras, amenazadas, en peligro de extinción, sujetas a protección especial, requieren a presentación de una manifestación de impacto ambiental en su modalidad general” Entre los siguientes instrumentos normativos que podrían considerarse en el aprovechamiento forestal del *A. angustifolia* se encuentran Ley Agraria, Ley Forestal, Ley de las Aguas Nacionales, Ley de Caza, Ley de Conservación del suelo, Ley federal de Sanidad Vegetal, Ley General de Salud, Ley Federal sobre Metrología y Normalización, Ley General de Bienes Nacionales, Ley Orgánica de Administración Pública Federal, Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA), leyes relacionadas con la Ley General que sean competencia de la Secretaria, reglamentos de la Ley General en materia, normas oficiales mexicanas, leyes y reglamentos estatales, reglamentos municipales, resoluciones de impacto ambiental, ordenamiento técnicos establecidos por la PROFEP, CNA, SIUE, o DEA (Núñez, 2004).

El *Agave angustifolia* es una planta que ha sido aprovechada por los pobladores de la sierra en la producción de BACANORA, esto ha ocasionado que la especie se encuentre en peligro de extinción, es por eso que se han desarrollado técnicas



biotecnológicas que son benéficas para el ambiente y su aprovechamiento representa ingresos económicos.

El ITSON se ha caracterizado por el estudio al medio ambiente y se encuentra dentro de los programas de estudio. El lugar donde se realizó el establecimiento aséptico del *A. angustifolia*, fue en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales situado en el edificio 700 de biotecnología del ITSON, la unidad Obregón-Náinari.

### **Objetivos.**

#### **Objetivo general:**

Establecimiento aséptico *in vitro* de la especie agave mezcalero (*Agave angustifolia Haw*), para la multiplicación masiva.

#### **Objetivos específicos:**

- ◆ Determinar el desinfectante idóneo para lograr el establecimiento aséptico de los explantes de agave mezcalero (*Agave angustifolia Haw*).
- ◆ Determinar la dosis de los desinfectantes para lograr el establecimiento *in vitro* del agave mezcalero (*Agave angustifolia Haw*).
- ◆ Determinar los tiempos de exposición a los desinfectantes para lograr el establecimiento *in vitro* del agave mezcalero (*Agave angustifolia Haw*).
- ◆ Determinar los efectos de distintas dosis de reguladores de auxinas y citocininas, en la inducción de callo a partir de explantes de hojas del Agave mezcalero (*Agave angustifolia Haw*).

- ◆ Determinar los efectos de distintas dosis de citocininas, para organogénesis indirecta, a partir de tejido de callo.

### **Hipótesis.**

Las hipótesis planteadas en base a los objetivos anteriores son que:

- ◆ Existe un desinfectante óptimo para lograr el establecimiento aséptico del los explantes.
- ◆ Existe una dosis adecuada de desinfección para lograr el establecimiento aséptico de los explantes.
- ◆ Existe el tiempo idóneo de exposición al desinfectante para lograr el establecimiento aséptico.
- ◆ Existe una dosis adecuada de reguladores de auxinas y citocininas, para la inducción de callo a partir de explantes de hojas de agave.
- ◆ Existe una adecuada dosis de citocininas para la organogénesis indirecta a partir de tejido calloso.

### **Supuestos.**

El genotipo de las variedades de *Agave angustifolia* no tiene efecto en los métodos de generación de organogénesis ni en el tipo de fitohormona utilizado.

## CAPITULO II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Generalidades

#### Historia del Agave en México

El agave (del griego agaus, que significa “admirable” o “noble”) se ha utilizado históricamente como fuente de alimentación, bebida y fibra por las diferentes tribus indígenas del Sureste de los Estados Unidos y el Norte de México (Castetter, Bell y Grive 1938; Gentry, 1982, citado por Núñez, 2004).

Los agaves son plantas adaptadas a condiciones de aridez. Son de raíces someras y ramificadas, cutícula gruesa, suculentos, estomas hundidos, metabolismo fotosintético y metabolismo ácido crasuláceos (MAC) son algunos de los atributos que les permite establecerse en zonas carentes de agua (Granados, 1999).

Mesoamérica y Árido América -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: como alimento, forraje, medicamento y construcción entre otras (Granados, 1999).

Cabe resaltar que de este vegetal se obtienen bebidas embriagantes dentro de las cuales sobresale el pulque. Esta bebida tiene un registro que data de 300 años a.c.; representa un importante papel social, ya que por motivos religiosos estaba contenida de fuerzas espirituales que se asociaba con una gran cantidad de dioses,

entre los más representativos la diosa del “Mayahuel” (figura 1), que están plasmados en la mayoría de los códices Mexicanos (Granados, 1999).



Fuente: <http://dana.ucc.nau.edu/~md276/pictures/agave-sideview.gif>

**Figura 1.** *Agave laughing.*

Desde épocas remotas las plantas de Agave o de Maguey, como se les llama comúnmente en México, han representado una importante fuente de alimentos, fibras, medicamentos y bebidas para las culturas prehispánicas de América del Norte. El aprovechamiento de estas plantas fue de vital importancia para los grupos indígenas asentados en las zonas semiáridas del México antiguo, en lo que actualmente es el Noroeste de México y Sudoeste de Estados Unidos (IMADES, 2002).

Entre las culturas prehispánicas que habitaban a lo largo de la costa del Pacífico mexicano, desde Sonora hasta Oaxaca, era común el consumo de bebidas fermentadas preparadas a partir de Agaves, las cuales se ingerían especialmente durante las ceremonias religiosas. Sin embargo, con la introducción de la técnica de destilación por los misioneros españoles en el siglo XVI, las bebidas fermentadas se sustituyeron por los destilados de Agave, los cuales, desde entonces han

evolucionado en diferentes productos destacando entre ellos el tequila en Jalisco, el mezcal en Oaxaca, el bacanora en Sonora, y en el centro del país el pulque que no es un destilado

Cada región tiene una bebida característica. En Sonora se llama bacanora (*Agave angustifolia*), en Chihuahua se llama sotol, en Chiapas se llama comiteco, en la costa de Jalisco, las serranías de los Altos y el oeste de Michoacán se llama raicilla (de producción casi clandestina y muy fuerte), en Oaxaca se le llama mezcal (*Agave espadín* de Oaxaca o *Agave angustifolia* Haw, arroqueño o *Agave americana* L. variación del *oaxacensis* Gentry, *tobasiche* o *agave karwinskii* zucc, barril o *Agave rodacantha* zucc, mexicano o *agave macrocantha*, maguey cincoañero o *Agave cantala roxb* y el agave silvestre más apreciado por la calidad de mezcal que origina es el *Agave potatorum* zucc o tobalá) y se llama tequila (*Agave tequilana* weber azul) en Jalisco (figura 2).

([http://elportaldemexico.com/bebidas/mezcales\\_y\\_tequilas.htm9](http://elportaldemexico.com/bebidas/mezcales_y_tequilas.htm9)).



Fuente: [http://www.fotomas.com/tequila\\_futures.htm](http://www.fotomas.com/tequila_futures.htm)

**Figura 2.** *Agave tequilana*.

## 2.2 Descripción botánica del *Agave angustifolia* Haw.

### 2.2.1 Clasificación taxonómica.

Taxonómicamente el género agave se ubica en la familia Agavaceae ver Tabla 1. En el continente Americano se reportan aproximadamente 310 especies, de las cuales en México existen 272, por ello se considera a este país como centro de origen del género (Granados, 1999).

**Tabla 1.** Clasificación Taxonómica de la especie *Agave angustifolia* Haw.

Reino:	Plantae
Phylum:	Angiospermae
Clase:	Monocotiledónea
Orden:	Liliales
Familia:	Agavaceae
Género:	Agave
Especie:	<i>angustifolia</i> Haw
Nombre común:	Magüey espadín o magüey mezcalero

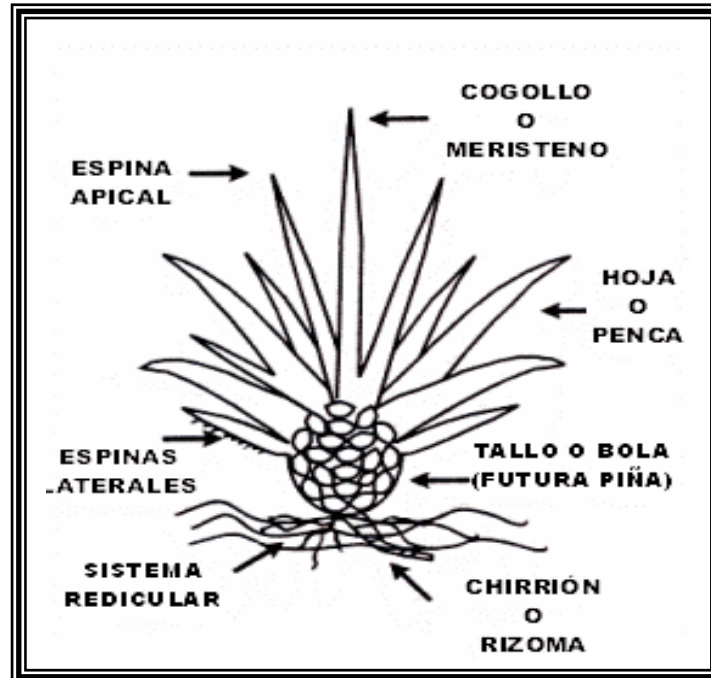
CONAFOR (s.f); Nobel, 1998

### 2.2.2 Anatomía del *Agave angustifolia* Haw.

El *Agave angustifolia*, presenta un ciclo de vida entre 5 y 20 años, al final del cual la planta florea, libera sus semillas y muere, sus pencas son suculentas, muy numerosas y están colocadas en forma de espiral formando una roseta basal, lo cual les ayuda a capturar la poca agua de lluvia disponible de una manera más eficiente (Gentry, 1982, citado por Núñez, 2004).

Los márgenes de sus pencas están armados con dientes rígidos y sus ápices en la mayoría de los casos terminan en una espina fuerte y rígida ver figura 3. La mayoría de los agaves están muy bien adaptados a los ambientes áridos, la principal característica, es que los agaves poseen el metabolismo ácido de las crasuláceas

(MAC), el cual le permite efectuar fotosíntesis y sobrevivir en condiciones de extrema sequía (IMADES, 2002).



Fuente: <http://www.acamextequila.com.mx/noflash/elagave/anatomia.gif>

**Figura: 3.** Anatomía del agave.

### 2.2.3 Metabolismo ácido de crasuláceas.

Las plantas de este tipo tienen un origen tropical seco y un metabolismo fotosintético adaptado a los medios áridos denominados metabolismo ácido crasuláceas (MAC), muy parecido a las plantas  $C_4$  excepto en la secuencia de la enzima que reacciona en la oscuridad y con demandas evapotranspirativas bajas. Por esto, fijan un máximo de  $CO_2$  en la noche (cuando el potencial hídrico de pérdida es bajo), cuya asimilación fotosintética ocurre durante el subsecuente periodo de luz; almacenamiento, los estomas se encierran disminuyendo así la pérdida de agua (Granados, 1999).

Las plantas (MAC o CAM) son suculentas y están representadas en las familias *Cactaceae*, *Crassulaceae*, *Agavaceae* etc. La suculencia representa sólo un sistema de acumulación de agua, tanto en los tejidos fotosintéticos como en aquellos que no lo son. Por otra parte la sobrevivencia de las plantas MAC en condiciones naturales con sequías prolongadas y erráticas depende mas de la posesión de una cubierta exterior, notablemente impermeable al agua la cual impide la desecación, que de una alta eficiencia en el uso de agua la asimilación de carbono, posibilitada por la fijación nocturna de CO<sub>2</sub> (Medina, 1987, citado por Granados, 1999).

#### **2.2.4 Importancia ecológica de la fijación nocturna de CO<sub>2</sub> por plantas MAC.**

La importancia ecológica de la fijación nocturna de CO<sub>2</sub> por plantas MAC radica en su contribución a la sobrevivencia de las mismas al proveer un mecanismo de recirculación interna de CO<sub>2</sub> en condiciones de sequía severa, que evita la inhibición del aparato fotosintético cuando el cierre estomático impide la absorción de CO<sub>2</sub> externo; además, la vía MAC contribuye a la producción de materia orgánica y crecimiento de la planta (Medina, 1987, citado por Granados, 1999).

#### **2.2.5 Principales requerimientos físicos y de nutrición.**

##### **2.2.5.1 Temperatura.**

El factor temperatura es importante desde el punto de vista fisiológico ya que determina la apertura de los estomas y por ende el intercambio gaseoso. La temperatura óptima para la fotosíntesis puede cambiar o ser igual a la temperatura ambiental de las plantas, tales como cambios se consideran adaptaciones, aclimataciones que tienen bases bioquímicas y que pueden ocurrir en periodos cortos de tan solo un día. Las plantas MAC abren sus estomas en la noche, cuando la temperatura del tejido es considerablemente baja y así la concentración de vapor



va del tejido al aire, se ha reportado que de 10 a 15°C es la temperatura óptima para la fijación de CO<sub>2</sub>. Los cambios de temperatura de las plantas MAC depende de la sensibilidad de los estomas y del clorénquima (Granados, 1999).

#### **2.2.5.2 Fluctuación fotosintética.**

Fluctuación fotosintética depende de una secuencia integrada de los eventos metabólicos que incluyen las reacciones fitoquímicas, la enzimología del carbón y el transporte de los intermediarios fotosintéticos entre los compartimentos subcelulares, el inherente potencial de la planta y las restricciones impuestas por las condiciones ambientales; determinado así la situación de una planta en un tiempo dado (Foster *et al.*, 1983, citado por Granados, 1999).

#### **2.2.5.3 Nutrición.**

El buen desarrollo de una planta depende en gran parte de la cantidad de nutrimentos (macro y micro) que existan en su cuerpo. El aporte de estos elementos en su mayoría los toma del suelo en forma de *humus* (restos de organismos aun no descompuestos) que constituyen una reserva que se va agotando; a largo plazo, los nutrientes provienen de los minerales que se meteorizan lentamente (Hernández y Mendieta, 1987, citado por Granados, 1999).

El nitrógeno es un elemento esencial para las respuestas fotosintéticas, pues cuando sus niveles son bajos también la fotosíntesis es baja y su intensidad, lo que se debe a que el nitrógeno es componente estructural de las enzimas que intervienen en el proceso (Mandujano, 1988, citado por Granados, 1999). Por otro lado Nobel *et al.*, 1983 en un trabajo con varias especies de cactus observaron que el nitrógeno y el sodio son elementos indispensables en el MAC ya que la síntesis de ácidos orgánicos incrementan.

En general los agaves viven en suelos rocosos arcillosos y bien drenados; ricos en nutrientes especialmente -nitrógeno, que parece ser el elemento más limitante e la actividad metabólica de algunos agaves. Los niveles de elementos en el suelo afectan la distribución de su hábitat nativo. Estas plantas son relativamente sensibles a la salinidad, sobre todo en su estado juvenil; pero no son muy sensibles a las altas concentraciones de Ca y metales como el Cu, el Zinc. El pH óptimo de crecimiento es entre 5 y 8, fuera de este rango son muy sensible (Granados, 1999).

### **2.2.6 Tipo de reproducción.**

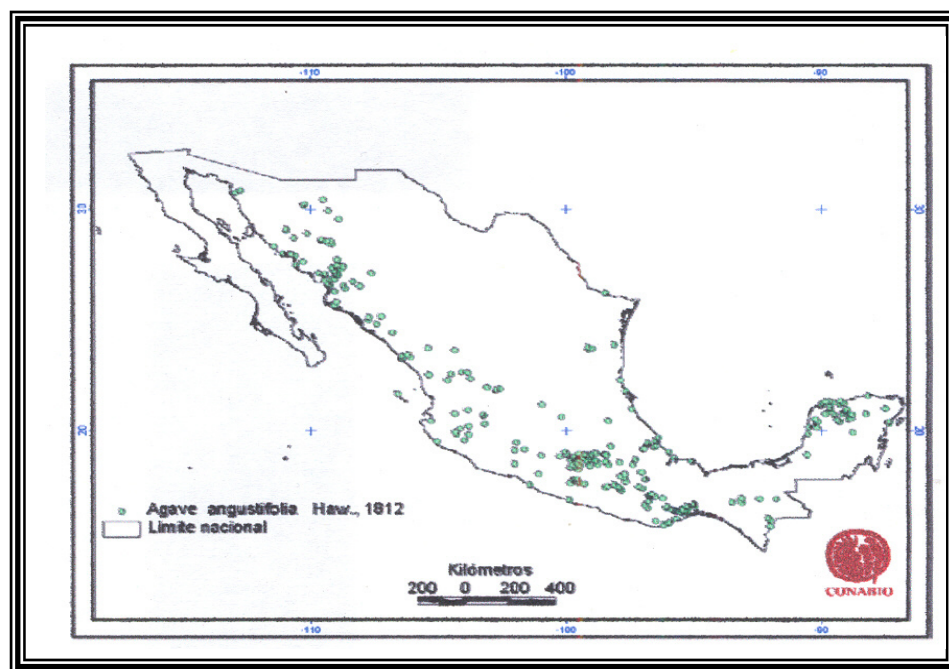
El *Agave angustifolia*, presenta dos tipos de reproducción: asexual y sexual. La primera es por medio de retoños los cuales nacen en la base o bien mediante propágulos que brotan eventualmente a partir de la inflorescencia. Los individuos que se producen mediante esta forma son genéticamente idénticos a la planta madre. Este método de propagación es lento, ya que cada planta empieza a dar “hijuelos” a los tres años en adelante. En cuanto a la reproducción sexual, esta se realiza a base de semillas, la desventaja de esta forma de reproducción es su bajo índice de germinación. Sin embargo la planta está sujeta a presentar una alta variabilidad genética (IMADES, 2002).

### **2.2.7 Distribución geográfica.**

Las agaváceas sólo se desarrollan en forma natural en el continente Americano. Se hallan desde el nivel del mar, donde crecen sobre las dunas costeras, hasta los bosques mesófilos de montaña a los 3,300 msnm; sin embargo su abundancia es mayor entre los 800 y 2,500 msnm. Es común observarlos en sitios soleados, pedregosos, en las laderas de las montañas o barrancas de los ríos y a veces en lugares planos, siempre sobre terrenos con buen drenaje. A pesar de la amplitud de esta área, el país donde se concentra el mayor número de especies es México,

seguido por los territorios contiguos del sur de los Estados Unidos, Guatemala y Cuba.

Los magueyes mezcaleros se encuentran distribuidos principalmente en la parte occidental de México, en los estados de Oaxaca, Puebla, Sonora, Durango, San Luís Potosí, Chihuahua y Jalisco. También hay en Nayarit, Sinaloa, Colima, Michoacán, Guerrero, Zacatecas, Tamaulipas y en casi todos los estados de la República, excepto en Tabasco (Figura 4).



Illesley, 2003

**Figura 4.** Distribución Geográfica del *Agave angustifolia* Haw.

La mayoría de los magueyes silvestres sólo crecen en México y en una pequeña parte del desierto en Estados Unidos, América Central y del Sur. México es el centro de origen de los magueyes, así como lo es del maíz (CIANOBIIO, 200).

La especie de *Agave angustifolia*, tiene la distribución más amplia de agaves en Norte América, se extiende de Costa Rica hasta el Desierto Sonorense (IMADES, 2002).

### **2.2.8 Cultivo y manejo del *Agave angustifolia*.**

#### ***Semillas***

El Aprovechamiento de semillas tiene una ventaja: la gran cantidad que se producen por planta, de 3 a 20 mil semillas viables por escapo floral. Es factible cosechar en abril a julio antes de las lluvias de verano, ya que esta ocasiona que la baya se abra y la semilla caiga al suelo, haciendo imposible su recolección. La emergencia varia según la época de establecimiento del almácigo: 85-90% de mayo a septiembre y 40-55% de enero a abril. Esto se ha presentado en almácigos establecidos en los municipios de Bacanora, Moctezuma, Sahuaripa, entre otros. Además del bajo porcentaje de emergencia observado de septiembre a febrero, el crecimiento es muy lento y si la temperatura mínima alcanza los  $-7^{\circ}\text{C}$ , se presenta una mortalidad del 45% en viveros. Una desventaja de este método es que es de lento crecimiento de las plantas. Se requiere de 30 a 36 meses bajo vivero, hasta alcanzar el peso y altura apropiado para sobrevivir en el agostadero o en condiciones de crecimiento sostenido (Valenzuela y Cervantes, 2000, citado por Núñez, 2004).

#### ***Bulbillos***

En relación con los bulbillos (hijuelos del escapo floral), éstos se forman de manera natural en ciertos predios ganaderos, principalmente de Bacanora, Moctezuma y Nacori Chico. Por general se presentan en cañadas, siendo distantes los agaves entre sí, pero muy cerca de árboles o arbustos de la misma altura o más grandes que los escapos y en continuo rozamiento. Durante los años 2000 y 2001 se recolectaron en estos sitios alrededor de 15,000 bulbillos. La tasa de crecimiento es de 40% mayor que en plantas de semilla y genéticamente igual a la madre. Es factible promover la aparición de bulbillos mediante la emasculación de los botones florales para evitar la formación de semillas y disponer así de bulbillos durante los meses de mayo a agosto (Venezuela y Cervantes, 2000, citado por Núñez, 2004).

### ***Hijuelos***

Con respecto a los hijuelos, el *A. angustifolia*, empieza a producir de rizomas entre cinco años de edad, según la región, el tipo de suelo y la precipitación. La ventaja de utilizar este método de propagación es la rapidez con que se obtienen plántulas de buen tamaño idénticas a la madre. La desventaja es que son pocas las poblaciones silvestres con hijuelos, para que sea económicamente viable la recolección de los mismos (Núñez, 2004).

#### **2.2.9 Establecimiento y Manejo.**

Una vez que se disponen de material vegetativo apropiado, el siguiente paso es el establecimiento de dichas plántulas en lugar donde se desarrollarán los siguientes ocho o nueve años. Las temperaturas, de  $-3$  a  $-7$  °C, son la limitante principal para el crecimiento inicial del agave, sobre todo en condiciones de agostadero. Es de primordial importancia elegir los sitios apropiados para la plantación. Deben ser laderas suaves, expuestas hacia el suroeste, o mesetas con abundante vegetación y los suelos de color pardo rojizo, con pH de 7.0 a 7.5, textura franco-arcillosa y con exposición al norte. En estos sitios la sobrevivencia no rebasa al 5%, debido a las bajas temperaturas

Cuando se dispone de hijuelos, plantas de semillas o bulbillos de tres años de edad, se procede a eliminar la mayor parte de las raíces y las puntas de las hojas. Lo primero, para promover la aparición de raíces más vigorosas y que se adapten al sitio definitivo de plantación, y lo segundo para facilitar el manejo de la planta. Para prevenir enfermedades fungosas, se recomienda la aplicación de fungicidas antes de la siembra (Venezuela, Cervantes, 2000, citado por Núñez, 2004).

### **2.2.10 Usos.**

Debido a que la caza de animales era difícil y algunas veces estacional, los indoamericanos primitivos usaban las plantas de su entorno para cubrir las necesidades básicas de su dieta. En el proceso se convirtieron en verdaderos expertos en agaves. Alrededor de la mitad de los excrementos humanos momificados con 9000 años de antigüedad, encontrados en cavernas de Tamaulipas, Puebla y México, contenían remanentes de agaves (Nobel, 1998).

#### ***Alimento***

La clave para hacer apetecible los agaves es su alto contenido de azúcar; y la clave para desdoblar los azúcares, que se producen de manera natural en los tejidos almidonosos; es el calentamiento. Al cocerlos se transforman en polisacáridos, en azúcares simples mas dulces y de fácil digestión. La cabeza es una piña grande que se utiliza para elaborar tequila. Los agaves cocidos se comen como alcachofas: las hojas se raspan con los dientes para aprovechar la parte comestible, dejando la fibra (Nobel, 1998).

En cierta parte de México se cosecha como alimento las flores del maguey. Otra delicia de los agaves son los gusanos que atacan a la base del tallo. Las larvas de las palomillas pardas de género *Agathymus* y *Megathymus* se consumen fritas (Nobel, 1998).

#### ***Bebidas***

La clave para la producción de bebidas del agave es la acumulación de carbohidratos, como azúcares y almidones. Los carbohidratos se acumulan en los tallos y en la base de las hojas, y los más rendidores por lo general tiene los tallos robustos y las bases de las hojas más gruesa. La bebida del agave más antigua que

aun se produce es el pulque, conocido por los aztecas, otras bebidas son el agua miel, mezcal, tequila y el bacanora; este último se produce en la sierra de Sonora (Nobel, 1998).

### **Fibras**

Desde hace tiempo se reconoce la fuerza que tienen las fibras del maguey, en la extensión de las hojas. Con certeza tales fibras se han usado en la fabricación de cordeles, tejidos, redes, sacos, muebles, carpetas, rellenos, para cojines, tapicería, cojines para sillas, cobertores, canastos, brazaletes, bandas para la cabeza, sandalias, ropa y otros objetos de tejidos, escudos, cepillos, hilo para pescar, instrumentos musicales, objetos para ceremoniales y más recientemente como material de construcción, papel y tableros de dardos (Nobel, 1998).

## **2.3 Micopropagación vegetativa por cultivo de tejido *in vitro*.**

### **2.3.1 Definición e Importancia.**

Al conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas se le conoce como Cultivo de Tejidos Vegetales (Pérez *et al.*, 1999).

Toda célula vegetal viva, cualquiera que sea su especialización, desde el momento en que está viva posee un núcleo capaz de reproducir las características de la planta de la cual proviene. A esta notable capacidad denominada totipotencia celular, el cultivo *in vitro* debe toda su extensión. Debido a ella, todo individuo del reino vegetal puede o podrá cultivarse *in vitro*; no hay excepciones. Sin embargo esto no quiere decir que el desarrollo actual de los medios de cultivo y el conocimiento que se

pueda tener del comportamiento de las diferentes especies vegetales permitan realizar de inmediato y sin problemas el cultivo *in vitro* de todas las plantas que existen en la tierra (Auge, 1986, citado por Gómez, 1999).

La técnica de propagación por cultivo de tejidos o micopropagación, representa una forma de propagación vegetativa que ofrece ventaja sobre los métodos tradicionales. Por ejemplo, permite la multiplicación clonal de plantas libres de enfermedades en un ambiente controlado evitando así las variaciones esenciales impredecibles de las condiciones medio ambientales en ecosistemas naturales (Lara, 2006).

El cultivo de células y tejidos vegetales ha permitido la manipulación de especies con diversos fines sin necesidad de tener la planta completa. Los estudios sobre el análisis del crecimiento y desarrollo de cultivos *in vitro* a nivel estructural permiten determinar: a) el momento en que los tejidos constituidos por células diferenciadas se empiezan a desdiferenciar, b) en que tipo de células o tejidos ocurre la desdiferenciación, c) el estado de diferenciación de los cultivos *in vitro* d) los procesos morfogénéticos (formación de órganos o embriones adventicios). Por lo anterior es posible plantear estrategias relacionadas con la manipulación o manejo biotecnológico adecuado de las especies, como: el tiempo de exposición de los explantes a ciertos fitorreguladores y demostrar los eventos morfogénéticos, entre otros (Gómez *et al.*, 2003).

### **2.3.2 Condiciones *in vitro* en las Cactáceas y el género *Agave*.**

Se ha demostrado que las condiciones del cultivo *in vitro* estimulan los ritmos de crecimiento de cactáceas, principalmente por alterarse su patrón de fijación de CO<sub>2</sub> (metabolismo fotosintético CAM), mismo que presentan especies del género *Agave*. Por ejemplo, las plantas derivadas *in vitro* de *Coryphantha mínima* y *Obregonia denegrii* presentan tamaños dos veces más grandes que las obtenidas por semilla en invernadero en un mismo período de tiempo. Esto es consecuencia de que la



actividad fotosintética se ve favorecida pues se demostró que la fijación de CO<sub>2</sub> se incrementa durante la noche y se extiende a los períodos con luz; representando entonces una alteración del metabolismo CAM (Malda y Ruiz, 1999 citado por Malda y Ruiz, 2004) inducido por el cultivo *in vitro*. Por otro lado, el medio de cultivo comúnmente utilizado para este tipo de propagación (medio Murashige-Skoog) es muy rico en nitrógeno, lo cual también puede ser un factor que influya en las tallas mayores de plantas tipo CAM cultivadas *in vitro*.

Dado que los agaves son plantas CAM facultativas, es posible esperar un comportamiento similar si se someten al cultivo *in vitro*; considerando también que factores típicos del ambiente *in vitro* como la alta disponibilidad de agua y nutrientes puedan jugar un papel importante en el crecimiento de las plantas (Malda y Ruiz, 2004).

#### **2.4. Fases de la micropropagación *in vitro*.**

##### **2.4.1 Fase 1. Establecimiento del explante de los cultivos axénicos.**

Consiste en la elección del explante y la esterilización del mismo para iniciar el cultivo axénico. La elección del explante depende de la especie y del sistema de proliferación. Es de esperarse un bajo porcentaje de establecimiento exitosos de los tejidos *in vitro* debido a los problemas de adaptación y contaminación; sin embargo, no se requiere mucho material para iniciar la etapa 2, ya que es ésta en donde se dará la proliferación.

##### **2.4.2 Fase 2. Multiplicación del tejido.**

Es donde se realiza verdaderamente la micropropagación, obteniéndose un gran número de nuevos brotes a partir de cantidades mínimas de tejido. Existen tres vías

para la multiplicación *in vitro*: la organogénesis, la embriogénesis somática y la multiplicación por yemas, ápices o meristemos. Los sistemas de organogénesis y embriogénesis somática, aunque pueden ser más rápidos y/o productivos que la propagación por yemas, ápices o meristemos, son más susceptibles a la generación de variantes en las plantas obtenidas, lo cual puede ser negativo en un esquema de propagación clonal.

### **2.4.3 Fase 3. Elongación y enraizamiento.**

En la etapa 2 generalmente se obtienen pequeños brotes, en la mayoría carentes de raíz y poca probabilidad de adaptarse con éxito a las condiciones ambientales externas. En esta etapa se pretende que los brotes formen su sistema radical al mismo tiempo que se elonguen para facilitar su manipulación y hacer más probable su adaptación a las condiciones ambientales externas.

### **2.4.4 Fase 4. Adaptación.**

Las plantas generadas *in vitro* presentan varias características peculiares que dificultan su adaptación al medio externo una vez concluido el periodo de cultivo. A continuación se detallan las más importantes:

- La humedad relativa dentro de los recipientes del cultivo suele ser muy alta, lo que provoca que las plantas generadas *in vitro* carezcan de algunos sistemas normales para evitar la pérdida de agua. Es por ello que el proceso de adaptación debe de ser gradual para permitir así el desarrollo paulatino de los sistemas de protección de la planta contra la desecación.
- Las plantas durante su cultivo *in vitro* no realizan una fotosíntesis normal y sus requerimientos de carbono son satisfechos por el medio. Es por ello que el

paso de las plantas generadas *in vitro* hacia la autotrofia debe de ser gradual, exponiéndola a incrementos paulatinos en la intensidad luminosa.

Una evidencia para determinar el momento en que la adaptación puede considerarse exitosa, es la aparición de hojas nuevas después de la transferencia al substrato (Pérez *et al.*, 1999).

## **2.5 Técnicas de esterilización y manipulaciones asépticas.**

### **2.5.1 Importancia de las condiciones de esterilidad.**

Son de fundamental importancia las condiciones de esterilidad en un laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales debido a que los medios empleados contienen nutrientes que favorecen al crecimiento de microorganismos los cuales compiten con el tejido sembrado provocando un lento crecimiento o inhibición por la producción de toxinas. Es por ello que el material vegetal se desinfecta superficialmente antes del cultivo *in vitro* en condiciones de asepsia en una cámara de flujo laminar (Hurtado y Merino, 1987).

Un aspecto importante de la micropropagación es el control de organismos patógenos y para obtener un cultivo completamente estéril deben eliminarse los organismos patógenos presentes en el explante según Imay, 1997. En cultivo de tejidos el crecimiento de la mayoría de los microorganismos es muy acelerado por lo que su presencia se hace visible a pocos días de haberse iniciado el cultivo. Sin embargo, existe una minoría para los cuales el medio no resulta apropiado por lo que son de lento crecimiento y no son fácilmente detectables y estos son los responsables en la mayoría de los casos del llamado efecto de halo alrededor de los explantes. Existen dos fuentes de contaminación:

1. **La manipulación.** Es aquella que proviene de los instrumentos utilizados y las condiciones en que se manipulan los mismos.
2. **El explante.** Es lo más difícil de controlar, ya que las superficies vegetales son el hábitat natural de un gran número de microorganismos potencialmente contaminantes. Además de los endofíticos, cuyo hábitat se encuentra dentro de los tejidos vegetales entre los espacios intercelulares e incluso dentro de las células.

El cultivo de tejidos se volvió posible con el descubrimiento de desinfectantes efectivos, tales como el hipoclorito de calcio y sodio. Tanto la efectividad del tratamiento como el daño del tejido viviente aumenta como respuesta al tiempo-dosis, de manera que se busca un equilibrio de esos factores (Tamayo, 1998).

La esterilización superficial de los tejidos se realiza utilizando compuestos químicos microbicidas; sin embargo, el daño no sólo es causado al microorganismo, sino también al tejido. El método general consta de hacer un lavado previo con agua corriente y un detergente suave; seguido de un tratamiento con un agente químico, y el enjuague con agua destilada estéril en un ambiente aséptico (Pérez *et al.*, 1999).

### **2.5.2 Agentes químicos utilizados en el control de organismos patógenos.**

#### **Sulfato de gentamicina con clorhidratos de oxitetraciclina (Bactrol).**

Es un bactericida humectable, que tiene un amplio espectro de control sobre enfermedades bacterianas de importancia económica en México. Sus ingredientes activos son antibióticos de sulfato de gentamicina con clorhidratos de oxitetraciclina. Se utiliza en cultivos de papa y pera.

La efectividad “*in vitro*” de los antibióticos puede ser una alternativa para el establecimiento aséptico de cultivos *in vitro*, cuando son tomados a nivel campo. La mezcla de sulfato de gentamicina con clorhidratos de oxitetraciclina ha sido utilizado en cepas de bacterias fitopatógenas *Erwinia caratovora subsp. Atroseptica* y *Xanthomonas vesicatoria* (ANÓNIMO, 2003).

### **Flutolanil (Moncut 50 WP).**

Es un fungicida en polvo humectable, sus ingredientes activos son flutolanil. Se utiliza en cultivos de papa.

El efecto *in vitro* del fungicida flutolanil, ha sido utilizado en el control de cepas de *Trichoderma Sp* y una de *Screrotina sclerotiorum* (LIB) Bary., con el objetivo de evaluar el comportamiento de las dos cepas de *Trichoderma*, sobre el crecimiento y esporulación de los hongos en presencia del fungicida flutolanil, en el control de *Sclerotinia sclerotiorum*, obteniendo resultados de inhibición frente a este fungicida (Mavares, 2002).

### **2.5.3 Oxidación en el cultivo *in vitro*.**

Es común que se presente el fenómeno de oxidación del explante y del medio de cultivo en la micropropagación de especies vegetales. Cuando se extrae un explante de la planta madre, la primera respuesta del tejido es la exudación de compuestos fenólicos en el sitio del corte, provocando un severo oscurecimiento del tejido y del medio circundante, lo que limita la respuesta del explante, provocando inclusive la muerte del mismo. Para mantener la capacidad de regeneración de los explantes, es importante la aplicación de agentes antioxidantes o absorbentes, que eviten la acción de los exudados fenólicos (Nahuat *et al.*, 2003).

Según García y Rafael, 2003, en el establecimiento de microesquejes de café (*coffea arabica* "CATIMOR"). La utilización de una mezcla de antioxidante de ácido ascórbico y ácido cítrico, permitió obtener microesquejes sanos que crecían apropiadamente en un medio de cultivo previamente seccionado. En algunos cultivos se utiliza en el medio nutritivo, o directamente en el explante, sustancias antioxidantes ácido cítrico y ácido ascórbico o incluso adsorbentes (carbón activado) para destoxificar el medio (Tamayo, 1998).

En la micropropagación de *Dracaena deremensis* var. Janet Craig. El ácido ascórbico utilizado en la fase inicial de la preparación de los explantes y durante la desinfección con el NaClO redujo la oxidación del tejido durante la disección e inoculación *in vitro* de los explantes (Blanco *et al.*, 2004).

#### **2.5.4 Heridas y estímulos mecánicos en hojas.**

Se sabe desde hace mucho tiempo, que la estimulación mecánica de los tejidos, de la hoja causa un aumento en la respiración por un tiempo corto, generalmente de unos minutos a una hora. El doblarla y el cortarla o fracturarla parece estimular al máximo la respiración los mecanismos son desconocidos. El herir o romper los tejidos estimulan mucho la respiración por tres razones:

- ♣ La primera es la rápida oxidación de los compuestos fenólicos que tiene un lugar cuando la organización, que mantiene a estos substratos separados de sus oxidasas, se rompen.
- ♣ La segunda, son los procesos normales de glicólisis y catabolismo oxidativo que aumenta conforme la disrupción de la célula o células causa una mayor accesibilidad de los substratos a la maquinaria enzimática de la respiración.
- ♣ Tercero, la consecuencia general de la herida es la reversión de ciertas

células en estado meristemático, seguido por la formación de callo y la "curación" o reparación de la herida (Bidwell, 1979).

## **2.6 Medios de cultivo *in vitro* de los tejidos vegetales.**

### **2.6.1 Medio de cultivo.**

El medio de cultivo debe de proporcionar a los tejidos nutrientes y factores de crecimiento necesarios para su diferenciación y crecimiento. El medio de cultivo esta constituido por dos grandes grupos: el medio basal (sustancias orgánicas e inorgánicas) y los reguladores de crecimiento. El medio más utilizado para el cultivo de tejidos vegetales es el medio MS, formulación desarrollada por Murashige y Skoog reportada en 1962 (ver anexo 2). En teoría los requerimientos nutricionales de los tejidos vegetales cultivados *in vitro* deben de ser similares a los que se presentan en la planta completa bajo condiciones normales. Deben de tomarse las siguientes consideraciones:

1. No son autótrofos, por lo que requieren de la adición de fuentes de carbono orgánico.
2. Requiere de sustancias orgánicas que no son capaces de producir como la timina.
3. La manera de obtener los nutrientes, es decir, en condiciones *ex vitro* las plantas los toman por medio de la raíz y en los cultivos la células expuesta al medio no son especializadas y son las responsable en adquirirlos (Ayerbe, 1990).

### **2.6.2 Agua.**

Constituye el 95% del medio nutritivo. Para los trabajos de investigación se recomienda que el agua sea destilada, y en caso de trabajar con protoplastos o meristemos, se debe de utilizar bidestilada (Ayerbe, 1990).

### **2.6.3 Agar.**

Es un polisacárido con una elevada masa molecular, que tiene capacidad para gelificar los medios. La concentración usual para el agar es 0,6 – 0,8%. Si se utiliza una concentración más baja (0,4%), el medio nutritivo permanece sin cuajar, sobre todo cuando el pH es bajo. Si la concentración es muy alta (1,0 %), el medio nutritivo queda muy sólido, haciendo difícil la inoculación. Si se utiliza una concentración del 0,6%, y el medio no adquiere rigidez, debe corregirse el pH; si el pH es más bajo que 4,5-4,8, un medio con 0,6% de agar no gelifica adecuadamente (Ayerbe, 1990).

### **2.6.4 Fuentes de carbono.**

Generalmente se usa una concentración de 1-5% de sacarosa, ya que este azúcar se sintetiza y se transporta de forma natural por las plantas. La concentración depende del tipo y edad del material vegetal, no causa toxicidad *in vitro* (Pérez *et al.*, 1999).

### **2.6.5 Vitaminas y otros elementos orgánicos.**

En condiciones normales, las plantas tienen la capacidad de sintetizar todas las vitaminas requeridas para su metabolismo, sin embargo, por alguna razón los tejidos



cultivados *in vitro* pierden total o parcialmente la capacidad de producirlas (Pérez *et al.*, 1999).

- **Vitaminas.** Una o varias de las siguientes vitaminas se utilizan: inositol (mio -inositol, meso – inositol; 100-200 mg/L); B1 (tiamina, aneurina, 0,1 – 5,0); ácido fólico (0,1 – 5,0), riboflavina (0,1 – 10), tocoferol (1-50). El mioinositol estimula el crecimiento de la mayoría de los tejidos.
- **Poliaminas.** Están relacionados con la diferenciación celular y el desarrollo durante la embriogénesis (Ayerbe, 1990).

#### 2.6.6 Complejos orgánicos.

Estimulan el crecimiento de los tejidos debido a la presencia de sustancias no identificadas pero requeridas para las células. Con este fin se utiliza agua de coco, extracto de levadura y de malta, endospermo de maíz, jugo de tomate, de naranja y piña, y el extracto de plátano. Deben de tomarse como último recurso, debido al poco control que se tiene sobre los componentes de los mismos (Pérez *et al.*, 1999).

#### 2.6.7 Nutrición mineral.

Si se elimina toda el agua de una planta y se determina luego su peso, la cantidad obtenida es llamada peso seco y corresponde a todas las restantes sustancias, inorgánica y orgánicas, contenidas en esa planta; y esa proporción se muestra en la tabla 2 (Pérez y Martínez- Laborde, 1994).

**Tabla 2.** Composición elemental de un tejido vegetal, expresado en porcentaje del peso seco correspondiente a cada elemento (Barceló *et al.*, 1992, citado por Pérez y Martínez- Laborde, 1994.)

Elemento	Símbolo	Proporción (en % del peso seco)
Carbono	C	45
Oxígeno	O	45
Hidrógeno	H	6
Nitrógeno	N	1.5
Potasio	K	1
Calcio	Ca	0.5
Magnesio	Mg	0.2
Fósforo	P	0.2
Azufre	S	0.1
Cloro	Cl	0.01
Hierro	Fe	0.01
Manganeso	Mn	0.005
Cinc	Zn	0.002
Boro	B	0.002
Cobre	Cu	0.0006
Molibdeno	Mo	0.00001

El 5 al 10% del peso seco corresponde a los macro y micronutrientes

### 2.6.8 Macronutrientes.

- **Nitrógeno (N):** es el más importante y abundante en la planta. Su esencialidad se debe a que forma parte de proteínas, bases nitrogenadas, coenzimas, clorofila, alcaloides, etc.

- **Fósforo (P):** forma parte de los nucleótidos, ácidos nucleicos, fosfolípidos y algunas coenzimas. Es necesario para la formación de enlaces anhidros de alta energía (ATP) y para la activación de varios metabolitos (azúcares-fosfatos).
- **Potasio (K):** necesario para la activación de enzimas en la síntesis de proteínas y de la respiración, así como regulador del potencial osmótico.
- **Calcio (Ca):** forma parte de las paredes celulares y lámina media, interviene en la permeabilidad de las membranas y en la formación del huso acromático durante la mitosis. Cofactor de enzimas hidrolíticas.
- **Magnesio (Mg):** forma parte de la clorofila y es cofactor de algunas coenzimas.
- **Azufre (S):** forma parte de tres aminoácidos esenciales: cistina, cisteína y metionina (Pérez y Martínez- Laborde, 1994).

Además de los macronutrientes anteriores, tanto las plantas normales como los tejidos cultivados *in vitro* requieren de otros compuestos inorgánicos en concentraciones generalmente menores. Estos actúan básicamente como cofactores enzimáticos y algunos en sistemas de transporte de electrones

#### 2.6.9 Micronutrientes.

- **Hierro (Fe):** forma parte de los citocromos y otras enzimas que intervienen en el transporte de electrones mediante reacciones de óxido-reducción; como cofactor y es necesario para la síntesis de clorofila.
- **Manganeso (Mn):** cofactor en enzimas e interviene en la síntesis
- **Cobre (Cu):** forma parte de enzimas y participa en reacciones de óxido-reducción.
- **Molibdeno (Mo):** en la reductasa del nitrato; en la nitrogenasa en la fijación del nitrógeno.
- **Cobalto (Co):** se requiere para la fijación simbiótica del N<sub>2</sub> (Pérez y Martínez-Laborde, 1994).

De los micronutrientes mencionados el Fe suele ser el más limitante debido a su tendencia a precipitar en los medios de cultivo, para evitarlo se suministra en forma de EDTA.

## **2.7 Reguladores *in vitro*.**

### **2.7.1 Reguladores de crecimiento.**

Son compuestos orgánicos sintetizados por la propia planta, que en pequeñas cantidades alteran el crecimiento o los patrones de desarrollo vegetal. Es por ello que el manejo de los tipos, concentraciones y combinaciones de estos compuestos pueden obtenerse como respuestas la formación de tejido células callosas, brotes, embriones somáticos y raíces. Los más utilizados en el cultivo de Tejidos Vegetales son los pertenecientes al grupo de las auxinas y citocininas, ya que son los que regulan los procesos de crecimiento y organización en los cultivos (Pérez *et al.*, 1999).

Para el desarrollo óptimo del cultivo *in vitro* de tejidos y órganos es necesario que, en adición a los nutrientes, se incluya en el medio de crecimiento una o más sustancias reguladoras como auxinas y/o citocininas, y en algunos casos también giberelinas o ácido abscísico. Por otro lado, los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como con la finalidad del cultivo *in vitro* (Lara, 2006).

### **2.7.2 Auxinas.**

Se relacionan con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y otros. En cultivo *in vitro* las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. Las auxinas más utilizadas

son: IBA (ácido indol-3-butírico), NAA (ácido naftalenacético), IAA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). El IBA y el NAA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos.

### **2.7.3 Citocininas.**

Están implicadas en la división celular, modificación de la dominancia apical, diferenciación de tallos y otros. En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citocininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citocininas más usadas son: BAP (bencilamino purina), cinetina y 2-iP (isopentenil-adenina).

### **2.7.4 Giberelinas.**

Existen multitud de giberelinas conocidas. La de mayor uso es el ácido girébelico (GA3), pero debe tenerse en cuenta que es muy sensible al calor. Comparado con las auxinas y citocininas, las giberelinas se utilizan raramente. La mayoría de los explantes sintetizan cantidades suficientes de este grupo de hormonas. Cuando se aportan giberelinas al medio de cultivo, su función principal es el alargamiento de las regiones subapicales (Lara, 2006).

### **2.7.5 Ácido abscísico.**

El ácido abscísico (ABA) en la mayor parte de los casos produce un efecto negativo en los cultivos *in vitro*, en determinados casos promueve la maduración de

embriones, y en cultivos de células en suspensión facilita la sincronización de la división celular.

## **2.8 Propagación masiva vía células callosas.**

Las células callosas es una masa amorfa de células vegetales poco diferenciadas y de rápida proliferación; que muestran características similares a las células parenquimatosas. Una de las características más importantes es la friabilidad que es la tendencia de disgregarse de las células. Por lo general, las altas concentraciones de auxina favorecen a la friabilidad. El tejido de células callosas puede ser un paso intermedio para la regeneración de plantas por las vías de embriogénesis somático u organogénesis.

### **2.8.1 Embriogénesis somática.**

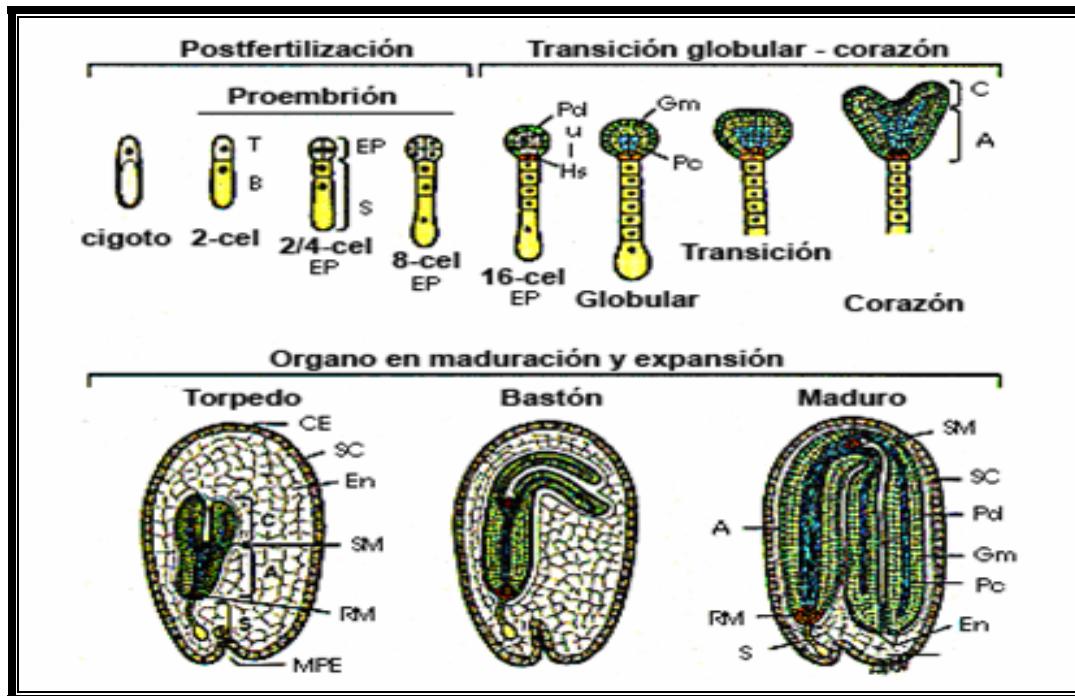
Es la capacidad de formar embriones por medio de un proceso asexual por lo que la nueva planta será exactamente igual a la donadora de la célula inicial. El proceso consta de varias etapas ver figura 5, de las cuales se requieren estímulos y fenómenos diferentes:

- 1. Inducción:** es el proceso de conversión de una célula somática a una célula proembriogénica.
- 2. Histodiferenciación:** las células proembriogénicas se diferencian formando embriones somáticos mediante una división y diferenciación celular simultánea. Durante esta etapa los embriones pasan por una serie de estadios; en el caso de la dicotiledóneas son: globular, corazón y torpedo.

3. **Maduración:** consiste básicamente en la elongación celular y sin división ya que un embrión en el estadio de torpedo no tiene la capacidad de germinar.
4. **Germinación.** Es el proceso de elongación y reactivación metabólica de un embrión somático maduro para convertirse en una plántula (Pérez *et al.*, 1999).

Se pueden distinguir 2 tipos de embriogénesis somática:

- **Directa:** se origina directamente a partir de una célula o tejido, sin que se produzca células callosas.
- **Indirecta:** primero se forma un células callosas, a partir del cual se forman después los embriones (Ayerbe, 1990).



Fuente: [http://www.umanitoba.ca/afs/plant\\_science/COURSES/39768/115/embryogenesis.gif](http://www.umanitoba.ca/afs/plant_science/COURSES/39768/115/embryogenesis.gif)

**Figura 5.** Proceso de la embriogénesis somática.

### 2.8.2 Organogénesis.

Se basa en la llamada totipotencialidad celular, donde cada célula posee toda la información genética necesaria para constituir una planta completa. Sin embargo se ha visto que no todos los tipos celulares son capaces de desencadenar el proceso de organogénesis; y esto puede ser por tres cosas:

1. **Genético:** no existe la totipotencialidad celular real o se carece de algún factor genético indispensable.
2. **Epigénico:** bloqueo reversible en la expresión de los genes responsables del proceso de organogénesis.
3. **Fisiológico:** a la falta de estímulos como los fitoreguladores, luz, entre otros para desencadenar el proceso.

La organogénesis puede ser directa o indirecta. La primera sucede cuando se genera a partir de un explante inicial; la segunda cuando se parte de tejido células callosas. Para determinar la eficiencia de un sistema se toman como parámetros el número promedio de brotes por explante así como el porcentaje de explantes que presentan brotes. Para ello es aconsejable el parámetro la Capacidad de Formación de Brotes (Pérez *et al.*, 1999).

### 2.9 Cultivo de tejidos en Agave.

En el género Agave, se ha reportado la embriogénesis somática para *A. victoria-reginae* (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996) partiendo de explantes de hoja, en un periodo de 2 a 6 semanas de cultivo en medio MS adicionado con un grupo de vitaminas denominado L2 y 0.3 mg/l de 2,4-D; con la germinación de embriones somáticos en medio MS de fuerza media en un lapso de 8 semanas y en medio SH de fuerza media en un lapso de 4 semanas, ambos careciendo de reguladores de crecimiento. Para *A. tequilana* Webber var azul se ha reportado embriogénesis somática indirecta,



siendo los mejores explantes para la formación de callos y la posterior producción de embriones somáticos, explantes de hoja de plántulas mantenidas *in vitro* (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996; Lara, 2006).

Para *A. cocui Trelease*, un agave de Venezuela, se estableció un protocolo para su propagación masiva mediante organogénesis indirecta a partir de hojas de plántulas mantenidas *in vitro*, obtenidas éstas, a su vez por medio de organogénesis directa; en medio MS adicionado con 2 mg/l de benzilaminopurina (BA) y 0.1 mg/l de ácido naftalenacético ([www.funflc.org.ve/webfunda/programas/agave/croi4](http://www.funflc.org.ve/webfunda/programas/agave/croi4)).

Para *A. parrasana Berger*, un Agave utilizado como planta ornamental nativo del estado de Coahuila, México, se reporta un método eficiente para su propagación *in vitro*. Se logró la obtención de brotes de buena calidad en medio MS adicionado con L2 vitaminas y con una concentración de benciladenina (Yépez *et al.*, 2002).

También para el henequén (*Agave fourcroydes Lem.*), es importante para la industria cubana, no solo por ser fuente de fibra si no también por sus subproductos. Se desarrollo una metodología para el mejoramiento genético, con el empleo de técnicas biotecnológicas y radiomutagénicas, así como métodos de propagación *in vitro*. Se establece una metodología de desinfección para el establecimiento *in vitro* con mas de un 98.50% de efectividad, utilizando concentración de NaClO 5% (hipoclorito de sodio al 5%) y se establece la obtención de callos en el medio Km. con 0.1 mg/l y 6 mg/l de ANA; y para la regeneración de plantas de plántulas vía organogénica, en el medio suplementado con 3 mg/l de BAP donde se obtienen de 20 a 30 plántulas por callo a los 60 días (Muñoz *et al.*, 2002).

## CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS

### Localización

El presente estudio se llevó a cabo, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales LV-717, del edificio 700 de biotecnología ubicado en la unidad Obregón-Náinari, ITSON.

### Materiales

#### Material Vegetal

Se colectaron explantes de hojas del *Agave angustifolia* obtenidas de los jardines en la unidad Obregón-Náinari, ITSON en Ciudad Obregón Sonora.

#### 3.1 Preparación del medio de Cultivo.

Los medios de cultivo, el agua y demás instrumentación de trabajo y materiales inherentes a este tipo de actividad fueron previamente esterilizados en auto clave 16 lb./in<sup>2</sup> y 121°C durante 20 minutos.

Para ello se requirió preparar soluciones madres tanto de fitorreguladores como de sales inorgánicas de Murashige-Skoog (MS) para la preparación de los medios, los cuales fueron preparados de la siguiente manera:

Se pesaron 100 mg de 2,4-D, 100 mg de ANA y 100 mg de BA y se disolvieron respectivamente en agua destilada estéril en vasos de precipitado de 100 ml, posteriormente se pasaron a un matraz de aforación de 100 ml para llevarlos a la concentración final de 1 mg/l. Sin embargo, se presentó dificultad para disolver la bencilaminopurina por lo que fue necesario realizar una dilución de la solución madre aforando de nuevo a un volumen final de 500 ml; es decir a una concentración de 0.2 mg/l de citocinina. Una vez preparadas se transfirieron a frascos ámbar estériles, se etiquetaron y se guardaron en refrigeración.

Se pesaron los gramos correspondientes de cada compuesto (ver anexo 1) para la preparación de las soluciones madres de Nitratos, Sulfuros, Halógenos, Fosfatos y EDTA con agua destilada estéril.

Una vez preparadas se transfirieron a frascos ámbar estériles para proteger el compuesto activo de la luz; se etiquetaron y se guardaron en refrigeración. Una vez realizados los medios se ajustó el pH a  $5.6 \pm 0.1$ ; se distribuyeron 20 ml de medio por frasco tipo gerber en cada una de las concentraciones, después se esterilizó en el autoclave a 16 lb/pulg<sup>2</sup> por 20 minutos.

### **3.2 Preparación de soluciones desinfectantes hipoclorito de sodio (NaClO), fungicida y bactericida.**

La preparación de soluciones desinfectantes para el establecimiento aséptico del explante *Agave angustifolia* se realiza en un ambiente aséptico (en medio de dos mecheros y con área asperjada con etanol al 70% con una espátula estéril.

#### **Hipoclorito de sodio**

Con una pipeta de 10 ml estéril, se extrajeron 10 ml de “cloro” comercial (que contiene 5% de hipoclorito de sodio) y se añadieron 95 ml de agua destilada estéril.

**Flutolanil (Moncut).**

Con una espátula estéril se tomó 3 g de funguicida, y se aforó a un litro con agua destilada estéril, se agito y tapó para disolver.

**Sulfato de gentamicina y clorhidrato de oxitetraciclina (Bactrol)**

Con una espátula estéril se tomó 0.1 g de bactericida y se aforó a un litro con agua destilada estéril, se agitó y tapó para disolver.

**3.3 Preparación de antioxidantes.****Ácido cítrico y ácido ascórbico**

La preparación de la solución de antioxidantes se trabajó en un ambiente estéril, al igual que los desinfectantes (Tabla 3), con una espátula estéril se pesó 150 mg de ácido cítrico y 100 mg de ácido ascórbico, se añadieron a un litro con agua destilada se agitó y se tapó para disolver, y se esterilizó en el autoclave a 16 lb/pulg<sup>2</sup> por 20 minutos.

**Tabla 3. Reactivos, materiales y equipo.**

<b>Reactivos</b>	<b>Material de laboratorio</b>	<b>Equipo</b>
2,4 - Diclorofenoxiacético	Probetas: 50, 100 y 1000 ml	Refrigerador
Ácido naftalenacético	Frascos de vidrio tipo gerber	Campana de flujo laminar
Bencilaminopurina	Tapas de plástico	Balanza analítica
Sales Murashige	Bisturí	Autoclave
Agar – agar	Pinzas	
Sacarosa	Cajas petri	
Hidróxido de sodio	Pipetas: 0.02, 1, 5 y 10ml.	

---

---

Ácido clorhídrico	Algodón
Mioinositol	Gasas estériles
Tiamina-HCL	Plástico adherente
Hipoclorito de sodio	Matraz Elenmeyer: 500, 1000 y 2000 ml
Alcohol	Matraz aforado:
Alcohol etílico: 96%, 70%,	Cubre bocas
Agua destilada	Fracos ámbar
Flutolanil (Moncut 50 WP).	Cofias
Sulfato de gentamicina con clorhidrato de oxitetraciclina (Bactrol).	Espátulas
	Mechero Bunsen
	Termómetro
	Guantes de asbesto
	Baño maría

---

---

### 3.4 Experimento I. Establecimiento aséptico de cultivos.

La finalidad de esta etapa es obtener un cultivo aséptico. Para esto se requiere que el explante pueda ser transferido sin problemas a un medio nutritivo sintético y que presente una buena reacción.

**Tratamientos de desinfección superficial del material vegetal.**

La micropropagación del *Agave angustifolia*, se inició con la desinfección del material vegetal provenientes del campo (hijuelos). En este procedimiento se realizaron tres ensayos, los cuales se hicieron a prueba y error. Se analizaron el efecto de los siguientes tratamientos.

Tratamiento I: Hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% durante 25 minutos.

Tratamiento II: Hipoclorito de sodio (NaClO) al 5%, durante 45 minutos.

Tratamiento III: Hipoclorito de sodio (NaClO) al 5%, + funguicida flutolanil (Moncut), 3 gr/l (Imay, 1997).

Tratamiento IV: Hipoclorito de sodio (NaClO) al 5%, + antibiótico sulfato de gentamicina con clorhidrato de oxitetraciclina (Bactrol), 1 gr/l.

Seleccionar una planta y tomar una porción de la planta de *Agave angustifolia*, para ser llevada por un proceso de desinfección.

**Tratamiento I: Hipoclorito de sodio (NaClO) al 5%.**

1. Se lavó el material vegetal con agua jabonosa, durante 1 minuto.
2. Se enjuagó el material vegetal con agua de la llave y luego con agua destilada estéril.
3. Se cortaron las secciones de 5 cm<sup>2</sup>, con un bisturí estéril.
4. Se sumergió el material vegetal con alcohol al 70%, por 30 segundos (a través de la gasa estéril).
5. Se colocó en hipoclorito de sodio al 5%, por 25 minutos (a través de la gasa estéril).
6. En la campana de flujo se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril.
7. En la campana de flujo se cortaron los explantes de 1 cm<sup>2</sup>
8. Se sumergieron los explantes en una solución estéril de antioxidantes (150 mg/l ácido cítrico + 100 mg/l ácido ascórbico) por un minuto (Tineo, 1989).

9. Posteriormente se sembraron los explantes en el medio nutritivo suplementado con tiamina-HCl, 1mg/l; mio-inositol, 100 mg/l; sacarosa, 30 gr/l; agar, 8 gr/l; bencilaminopurina (BA) 0.1 mg/l; ácido naftalenacético (ANA) 0.1 mg/l y 150 mg/l ácido cítrico, 100 mg/l ácido ascórbico. (Yépez *et al.*, 2002; Tineo 1989)

#### **Tratamiento II: Hipoclorito de sodio (NaClO) al 5%, durante 45 minutos**

1. Se lavó el material vegetal con agua jabonosa, durante 1 minuto.
2. Se enjuagó el material vegetal con agua de la llave y luego con agua destilada estéril.
3. Se cortaron las secciones de 5 cm<sup>2</sup>, con un bisturí estéril.
4. Se sumergió el material vegetal con alcohol al 70%, por 30 segundos (a través de la gasa estéril).
5. Hipoclorito de sodio doble al 5 %:
  - a. Se colocó en hipoclorito de sodio al 5%, por 25 minutos (a través de la gasa estéril).
  - b. Se colocó en hipoclorito de sodio al 5%, por 20 minutos (a través de la gasa estéril).
6. En la campana de flujo se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril.
7. En campana de flujo se cortaron los explantes de 1 cm<sup>2</sup>.
8. Se sumergieron los explantes en una solución estéril de antioxidantes (150 mg/l ácido cítrico + 100 mg/l ácido ascórbico) por un minuto (Tineo, 1989).
9. Posteriormente se sembraron los explantes en el medio nutritivo suplementado con tiamina-HCl, 1mg/l; mio-inositol, 100 mg/l; sacarosa, 30 gr/l; agar, 8 gr/l; bencilaminopurina (BA) 0.1 mg/l; ácido naftalenacético (ANA) 0.1 mg/l y 150 mg/l ácido cítrico, 100 mg/l ácido ascórbico (Yépez *et al.*, 2002; Tineo 1989).

---

**Tratamiento III: Hipoclorito de sodio (NaClO) al 5%, + funguicida flutolanil (Moncut), 3 gr/l.**

1. Se lavó el material vegetal con agua jabonosa, durante 1 minuto.
2. Se enjuagó el material vegetal con agua de la llave y luego con agua destilada estéril.
3. Se cortaron las secciones de 5 cm<sup>2</sup>, con un bisturí estéril.
4. Se sumergió el material vegetal con alcohol al 70%, por 30 segundos (a través de una gasa estéril).
5. Se colocó en hipoclorito de sodio al 5%, por 25 minutos (a través de la gasa estéril).
6. Se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril.
7. Se sumergió en una solución en funguicida flutolanil (Moncut), 3 gr/l
8. En campana de flujo se cortaron explantes de 1 cm<sup>2</sup>.
9. Se sumergieron los explantes en una solución estéril de antioxidantes (150 mg/l ácido cítrico + 100 mg/L ácido ascórbico) por un minuto (Tineo, 1989).
10. Posteriormente se sembraron los explantes en el medio nutritivo suplementado con tiamina-HCl, 1mg/l; mio-inositol, 100 mg/l; sacarosa, 30 gr/l; agar, 8 gr/l; bencilminopurina (BA) 0.1 mg/l; ácido naftalenacético (ANA) 0.1 mg/l y 150 mg/l ácido cítrico; 100 mg/l ácido ascórbico (Yépez *et al.*, 2002; Tineo 1989).

**Tratamiento IV: Hipoclorito de sodio (NaClO) al 5%, + antibiótico sulfato de gentamicina con clorhidrato de oxitetraciclina (Bactrol), 0.1 gr/l.**

1. Se lavó el material vegetal con agua jabonosa, durante 1 minuto.
2. Se enjuagó el material vegetal con agua de la llave y luego con agua destilada estéril.
3. Se cortaron las secciones de 5 cm<sup>2</sup>, con un bisturí estéril.



4. Se sumergió el material vegetal con alcohol al 70%, por 30 segundos (a través de una gasa estéril).
5. Se colocó en hipoclorito de sodio al 5%, por 25 minutos (a través de la gasa estéril).
6. En la campana de flujo se enjuagaron 3 veces con agua destilada estéril.
7. Se sumergió en el antibiótico sulfato de gentamicina con clorhidrato de oxitetraciclina (Bactrol), 0.1 gr/l
8. En campana de flujo cortar los explantes de 1 cm<sup>2</sup>.
9. Se sumergieron los explantes en una solución estéril de antioxidantes (150 mg/l ácido cítrico + 100 mg/l ácido ascórbico) por un minuto (Tineo, 1989).
10. Posteriormente se sembraron los explantes en el medio nutritivo suplementado con tiamina-HCl, 1mg/l; mio-inositol, 100 mg/l; sacarosa, 30 gr/l; agar, 8 gr/l; bencilminopurina (BA) 0.1 mg/l; ácido naftalenacético (ANA) 0.1 mg/l y 150 mg/l ácido cítrico; 100 mg/l ácido ascórbico (Yépez *et al.*, 2002; Tineo 1989).

Los explantes fueron sembrados *in vitro* en frascos tipo "Gerber", se ubicaron en la cámara de crecimiento bajo las siguientes condiciones físicas:

- Temperatura: 25 +/-2°C.
- Fotoperiodo de 16 /8hr.
- Intensidad lumínica de 3000-5000 luxes.

Las variables estudiadas en un periodo de 28 días, se evaluaban cada semana, en cada uno de los tratamientos en esta etapa fueron las siguientes:

- Contaminación
- Oxidación

Los datos originados a término de este periodo fueron analizados EXCEL, en un diseño estadístico completamente al azar.

**3.5 Experimento II. Inducción de células callosas de *Agave angustifolia* Haw, utilizando dosis de 2,4-D (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l ), y BA (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l).**

La inducción de células callosas *Agave angustifolia* se inició utilizando como explantes de hojas previamente desinfectadas como se indica en el experimento I. Para la regeneración de callo, a partir de explante de hoja de *Agave angustifolia* se utilizó el siguiente medio nutritivo suplementado con tiamina-HCl, 1mg/l; mio-inositol, 100 mg/l; sacarosa, 30 gr/l; agar, 8 gr/l; 150 mg/l ácido cítrico; 100 mg/l ácido, ascórbico y una combinación hormonal de diclorofenoxiacético (2,4-D) y bencilaminopurina (BA), Los tratamientos utilizados se presentan en la tabla 4.

Las respuestas a los tratamientos fueron tomadas cada semana durante 28 días y las variables estudiadas fueron las siguientes:

- Diámetro de células callosas
- Rizogénesis (Presencia de raíces)
- Brotación (Presencia de brotes)
- Contaminación
- Oxidación

Los datos originados a término del periodo, fueron analizados con el paquete estadístico FAUANL VERSIÓN 2.5 FACULTAD DE AGRONOMIA UANL Marín N. L. El diseño estadístico utilizado fue arreglo en parcelas divididas, con una significancia al 0.05 de la prueba de *t*.

**Tabla 4.** Tratamientos de auxina y citocinina utilizados para la inducción de células callosas de *Agave angustifolia* Haw.

TRATAMIENTO	AUXINA (2,4-D) mg/l	CITOCININA (BA) mg/l
1	0	0
2	1.5	0
3	1.0	0
4	1.5	0
5	2.0	0
6	0	0.5
7	0.5	0.5
8	1.0	0.5
9	1.5	0.5
10	2.0	0.5
11	0	1.0
12	0.5	1.0
13	1.0	1.0
14	1.5	1.0
15	2.0	1.0
16	0	1.5
17	0.5	1.5
18	1.0	1.5
19	1.5	1.5
20	2.0	1.5
21	0	2.0
22	0.5	2.0
23	1.0	2.0
24	1.5	2.0
5	2.0	2.0

**3.6 Experimento III. Inducción de células callosas de *Agave angustifolia* Haw, utilizando dosis de 2,4-D (0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/l), y BA (0.0, 0.25, 0.75, 1.0 mg/l).**

Se diseñó un nuevo experimento, en base a los resultados obtenidos del experimento anterior, buscando optimizar aún más el proceso. Se utilizó el mismo medio nutritivo suplementado con tiamina-HCl, 1mg/l mio-inositol, 100 mg/l sacarosa, 30 gr/l; agar, 8 gr/l; 150 mg/l ácido cítrico; 100 mg/l ácido ascórbico, y otra combinación de fitorreguladores: diclorofenoxiacético (2,4-D) y bencilaminopurina (BA). Los tratamientos utilizados se presentan en la tabla 5.

Las respuestas a los tratamientos fueron tomadas cada semana durante 28 días y las variables estudiadas fueron las siguientes:

- Diámetro de células callosas
- Rizogénesis (Presencia de raíces)
- Brotación (Presencia de brotes)
- Contaminación
- Oxidación

Al terminó de los 28 días, los datos originados fueron analizados con el paquete estadístico FAUANL VERSIÓN 2.5 FACULTAD DE AGRONOMIA UANL Marín N. L. El diseño estadístico utilizado fue arreglo en parcelas divididas, con una significancia al 0.05 de la prueba de *t*.

**Tabla 5.** Tratamientos de auxina y citocinina utilizados para la inducción de células callosas de *Agave angustifolia* Haw.

TRATAMIENTO	AUXINA (2,4-D) mg/l	CITOCININA (BA) mg/l
1	0	0
2	0.25	0
3	0.5	0
4	0.75	0
5	1.0	0
6	0	0.25
7	0.25	0.25
8	0.5	0.25
9	0.75	0.25
10	1.0	0.25
11	0	0.5
12	0.25	0.5
13	0.5	0.5
14	7.5	0.5
15	1.0	0.5
16	0	0.75
17	0.25	0.75
18	0.5	0.75
19	0.75	0.75
20	1.0	0.75
21	0	1.0
22	0.25	1.0
23	0.5	1.0
24	0.75	1.0
25	1.0	1.0

### 3.7 Experimento IV. Inducción de Organogénesis sobre tejido calloso del *Agave angustifolia* Haw.

Para inducir la organogénesis sobre tejido de callo se trabajó con el material de tejido calloso del experimento II y III. Se utilizó el medio nutritivo suplementado con tiamina-HCl, 1mg/l; mio-inositol, 100 mg/l; sacarosa, 30 gr/l; agar, 8 gr/l; 150 mg/l ácido cítrico; 100 mg/l ácido ascórbico, en ausencia de auxina utilizando diferentes concentraciones de bencilaminopurina (BA), (Tabla 6), Se obtuvieron 25 secciones de dicho tejido que se distribuyeron en 25 frascos gerber conteniendo 25 ml del medio de cultivo. Se evaluó el porcentaje de formación brotes en el periodo de 28 días.

**Tabla 6.** Tiramientos utilizados para la inducción de organogénesis.

AUXINA (BA) mg/l	TRATAMIENTO
0	1
2.5	2
5	3
7.5	4
10	5

Las respuestas a los tratamientos fueron tomadas cada semana durante 28 días y las variables estudiadas fueron las siguientes:

- Diámetro de células callosas
- Rizogénesis (Presencia de raíces)
- Brotación (Presencia de brotes)
- Contaminación
- Oxidación

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico FAUANL VERSIÓN 2.5 FACULTAD DE AGRONOMIA UANL Marín N. L. El diseño estadístico utilizado fue arreglo en parcelas divididas, con una significancia al 0.05 de la prueba de *t*.

## CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

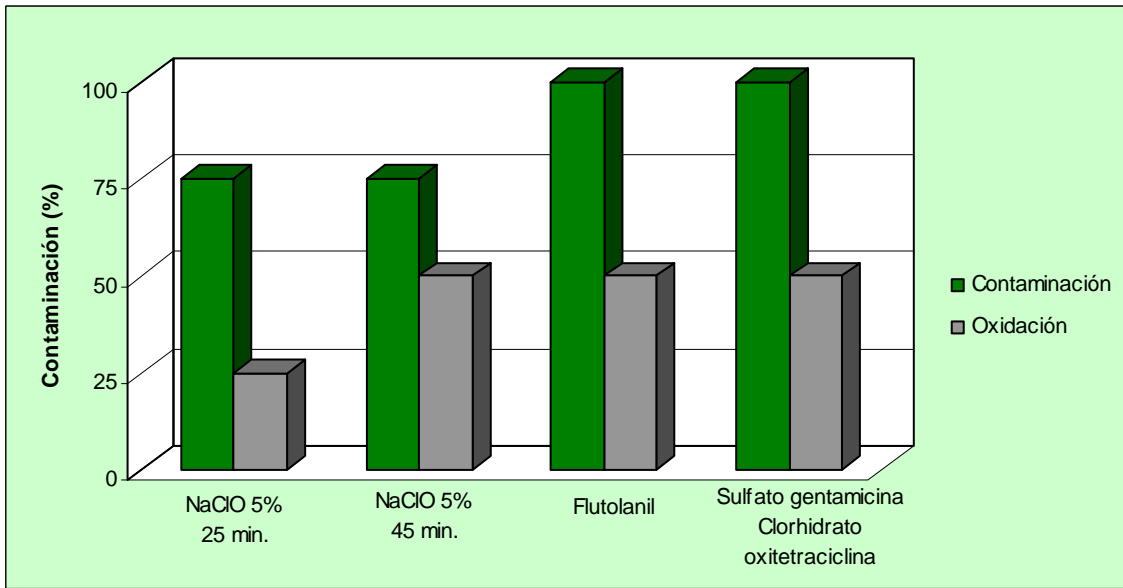
### 4.1 Experimento I. Establecimiento aséptico de cultivos.

En esta fase se realizaron tres experimentos a prueba y error; el primero fue con el fin de evaluar la habilidad en el manejo de los materiales, el equipo y dar respuesta a los tres primeros objetivos planteados en esta investigación.

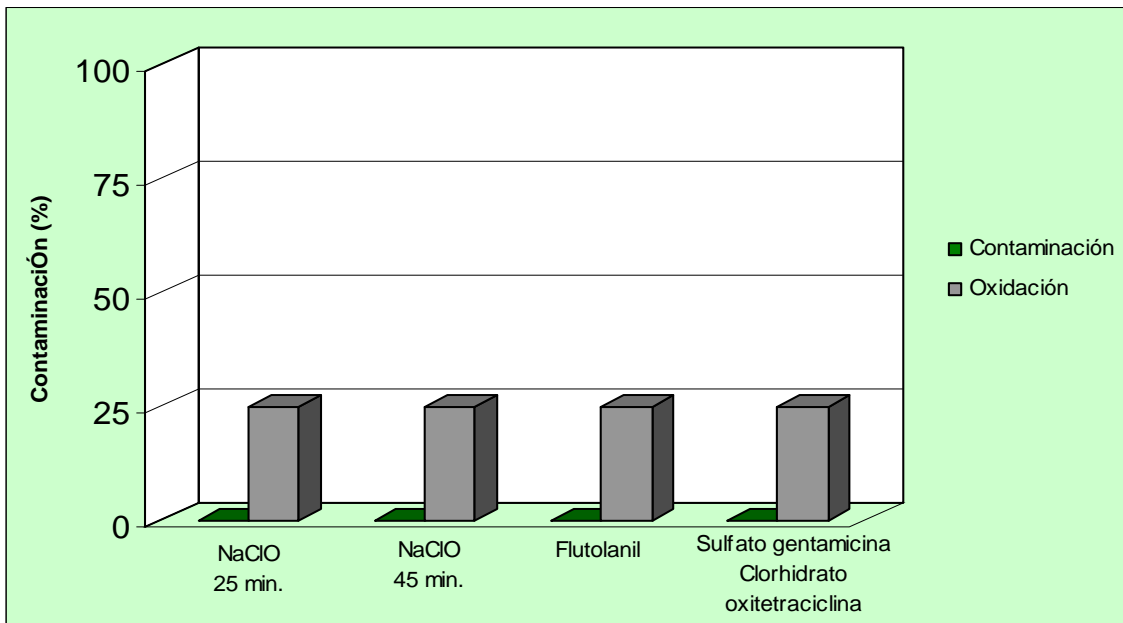
**Primer ensayo.** Durante el periodo de un mes se observó un porcentaje de contaminación de 100% para el tratamiento flutolanil y el sulfato de gentamicina con clorhidrato de oxitetraciclina, seguido de un 75% con los tratamientos NaOCl al 5% (durante 25 minutos) y NaClO al 5% (durante 45 minutos). En cuanto a los porcentajes de oxidación se observó un 25 % con el tratamiento de NaOCl al 5% (durante 25 minutos), mientras en los tres restantes se observó un 50%, ver figura 6, debido a las exudaciones del tejido que se presentan al sufrir el daño por el corte presentandose un mecanismo de defensa que provoca la liberación de fenoles (Bidwell, 1979).

**Segundo ensayo.** Durante este experimento se observó en un mes, en los cuatro tratamientos la contaminación fue nula. En cuanto a la oxidación se presento un porcentaje de 25% en todos los tratamientos estudiados (figura 7).



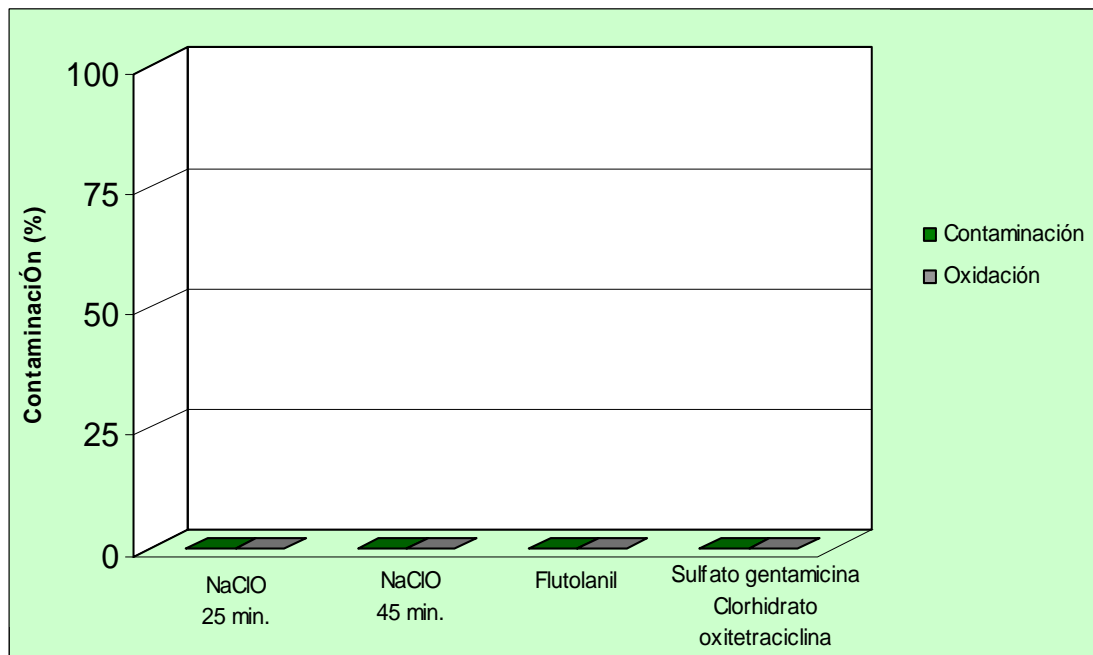


**Figura 6.** Porcentajes de contaminación y oxidación entre tratamientos, sobre el tejido de hoja *Agave angustifolia* Haw, en el periodo de un mes (primer ensayo). ITSON 2005-2006.



**Figura 7.** Porcentajes de contaminación y oxidación entre tratamientos, sobre el tejido de hoja *Agave angustifolia* Haw, en el periodo de un mes (segundo ensayo). ITSON 2005-2006.

**Tercer ensayo.** En este último experimento no se presentó oxidación ni contaminación en los cuatro tratamientos estudiados (figura 8).



**Figura 8.** Porcentajes de contaminación y oxidación entre tratamientos, sobre el tejido de hoja *Agave angustifolia* Haw, en el periodo de un mes (tercer ensayo). ITSON 2005-2006.

De acuerdo a los resultados obtenidos se cumplen los tres primeros objetivos específicos planteados para esta fase de la investigación. Según los resultados obtenidos el NaClO al 5%, tiene el mismo efecto que los productos comerciales: flutolanil (Mancut) y sulfato de gentamicina con clorhidrato de oxitetraciclina (Bactrol), según los análisis de varianza realizados (ver tabla 7, anexo 2). Sobre el tiempo de exposición para desinfectar los explantes de agave se sugiere que sea de 25 minutos ya que no existe diferencia significativa entre 25 y 45 minutos que fueron los tiempos estudiados. Por lo tanto el mejor tratamiento es el de NaClO al 5% por 25 minutos, ya que si el efecto es el mismo debe considerarse exponer los tejidos a los desinfectantes por un tiempo mínimo para disminuir el daño a los tejidos vegetales

por cualquier agente químico que elimine microorganismos (Pérez *et al.*, 1999 citados por Gurrola, 2005).

En estudios realizados para mejoramiento genético del henequén (*Agave fourcroydes*), para el establecimiento aséptico de los explantes, se ha utilizado el NaClO al 5%, con una eficiencia en cuanto a la desinfección, según sea la concentración utilizada del desinfectante, duplicándose el número de explantes libres de contaminantes al incrementar la concentración de este compuesto durante 20 minutos y la utilización de NaClO al 5%, (doble tiempo de desinfección) aumentando considerablemente entre 82.9 % y 99.40 % (Muñoz *et al.*, 2002).

#### **4.2 Experimento II. Inducción de células callosas de *Agave angustifolia* Haw, utilizando dosis de 2,4-D (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l), y BA (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l).**

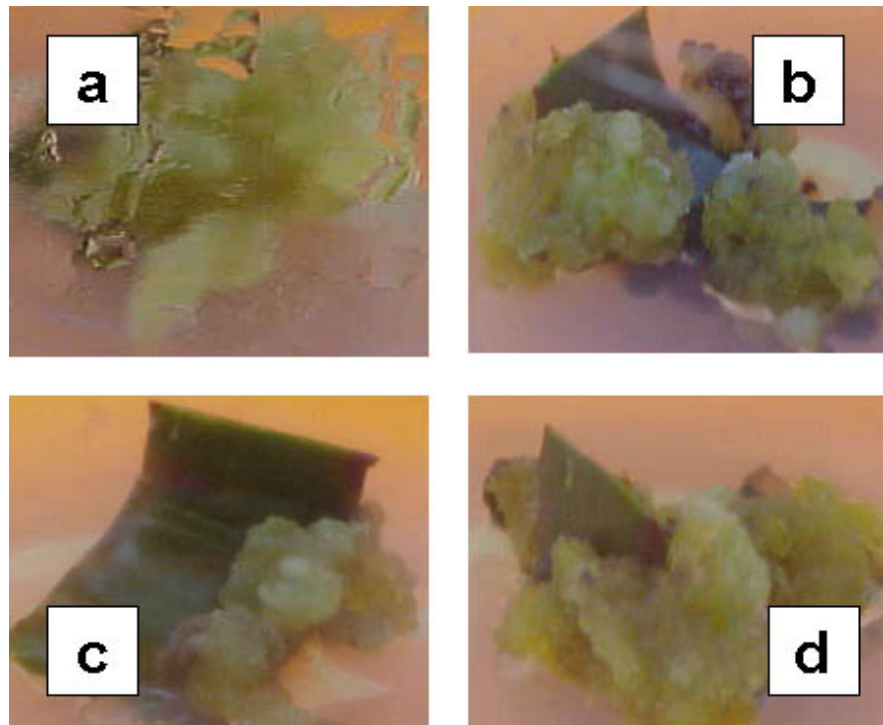
En esta etapa se obtuvo la desdiferenciación de células diferenciadas de hoja a células callosas, utilizando diferentes concentraciones de fitorreguladores 2,4-D y BA. Los explantes fueron escindidos de los hijuelos provenientes de las plantas de agave, estos explantes fueron desinfectados con el tratamiento de NaClO al 5% (25 minutos), según resultados obtenidos del primer experimento.

Según los resultados obtenidos con el diámetro de callo entre semanas (como tiempo de obtención), se encontró que existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos estudiados, de acuerdo al ANOVA (ver tabla 8, anexo 2), por lo que se realizó la prueba de *t*, con una significancia 0.05 resultando una diferencia mínima significativa (DMS) 0.3457, y observando que a la segunda semana no existe diferencia respecto a las demás, es decir que si se quiere obtener células callosas con 2,4-D y BA, en dos semanas se pueden obtener los resultados deseados (ver tabla 9, anexo 2).

Se pudo observar también que existe diferencia altamente significativa entre las diferentes concentraciones de 2,4 -D y BA estudiadas, según el análisis de varianza (ver tabla 8, anexo 2). La prueba de *t*, para este factor con una significancia del 0.05, muestra las medias del Factor B (diámetro de callo entre los tratamientos) las cuales se muestran en la tabla 10 (ver anexo 2).

Según (Yépez *et al.*, 2002), la inducción de células callosas en *Agave cucui* es factible a partir de secciones de hojas. La obtención de callo es viable a partir de hojas sembradas en medio de MS (1962) y concentraciones de 1mg/l de 2,4-D y 1 mg/l de BA con condiciones de 16/8 horas de fotoperíodo *in vitro*.

Las células callosas obtenidas se observaron como estructuras amorfas, friables, globulares translúcidas, de color verde (figura 9).



**Figura 9.** Inducción de callo a partir de hojas de plantas de *Agave angustifolia* Haw. Tratamiento 7 (a), tratamiento 3 (b), tratamiento 2 (c) y tratamiento 14 (d). ITSON 2005-2006.

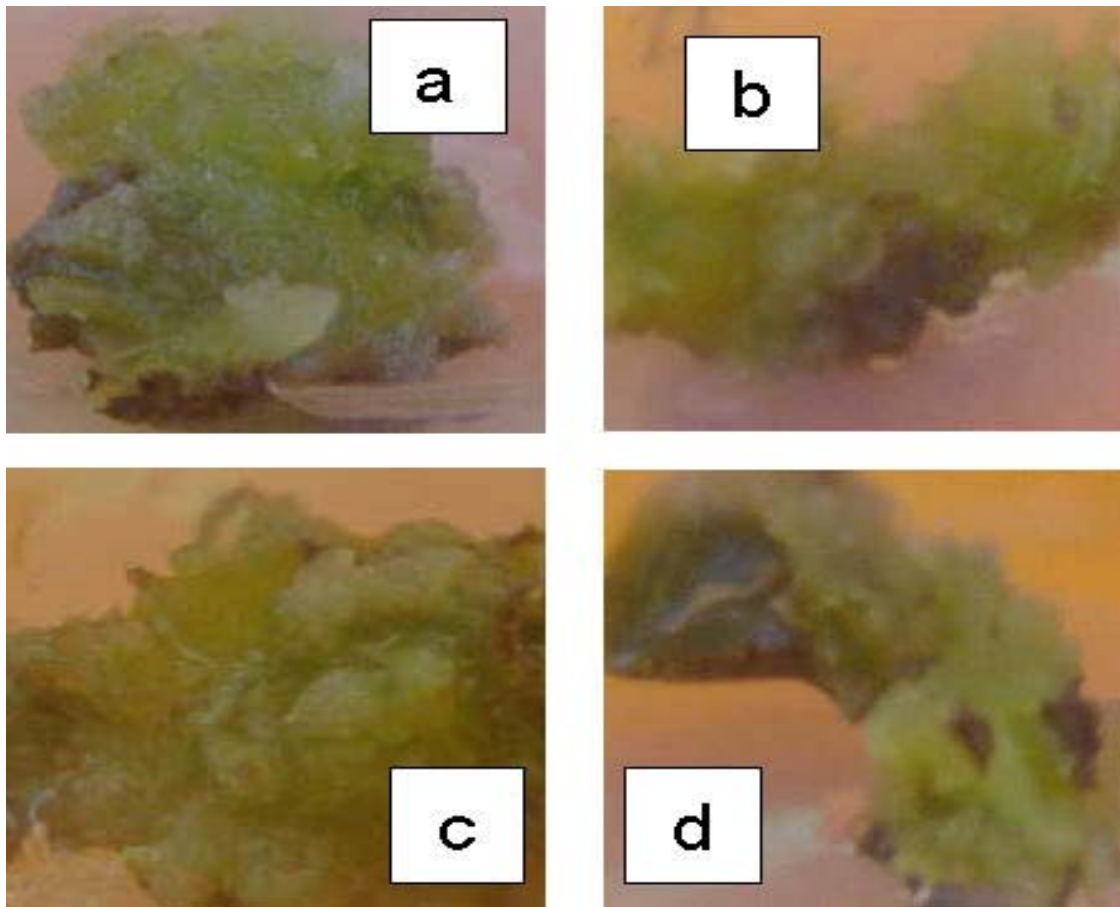
En la tabla 10 (anexo 2), con la prueba de  $t$  y con una significancia al 0.05 y DMS 0.4335, se observó que los tratamientos que obtuvieron mejores resultados con respecto a la variable diámetro de callo son los tratamientos 14 (1.5 mg/l, 2,4 -D, 1.0 mg/l BA) y 7 (0.5 mg/l 2,4 -D y 0.5 mg/l BA) y 3 (1.5 mg/l 2,4 -D y 1.5 mg/l BA).

#### **4.3 Experimento III. Inducción de células callosas de *Agave angustifolia* Haw, utilizando dosis de 2,4-D (0.0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/l), y BA (0.0, 0.25, 0.75, 1.0 mg/l).**

Al igual que en el segundo experimento de esta etapa se logró la inducción de células callosas, los explantes se escindieron de los hijuelos de plantas de agave, los cuales fueron desinfectados con el tratamiento de NaClO al 5% durante 25 minutos y se evaluaron las mismas variables del experimento II.

Se analizaron los resultados obtenidos en este experimento con la variable diámetro de callo, encontrándose que existe diferencia altamente significativa entre las semanas y con interacción (ANOVA que se observa en la tabla 11, anexo 2), por lo que se realizó la prueba de  $t$ , con una significancia 0.05, DMS 0.5972, tomándose como Factor A (diámetro de callo entre semanas) y factor B (diámetro de callo entre los tratamientos), ver tabla 12, anexo 2. Estos resultados muestran que a partir de la tercera semana no existe diferencia estadística respecto a las demás, es decir que si se quiere obtener células callosas con los fitorreguladores 2,4 -D y BA, con las concentraciones utilizadas en esta investigación se logran en tres semanas.

Según el análisis de varianza (tabla 11, anexo 2), se puede observar también que existe diferencia altamente significativa entre las diferentes concentraciones de 2,4 -D y BA estudiadas. En la tabla 13, anexo 2, con una significancia al 0.5, DMS 0.3312, en la prueba de  $t$ , se observa al igual que el ANOVA, hay diferencia entre los niveles de B (diámetro de callo), la prueba de  $t$ , En la tabla anterior se observa el mejor tratamiento es el 7 (0.25 mg/l 2,4-D, 0.25 mg/l BA), figura 10.



**Figura 10.** Inducción de callo a partir de hojas de plantas de *Agave angustifolia* Haw. Tratamiento 7 (a), tratamiento 9(b), tratamiento 15 (c) y tratamiento 25 (d).ITSON 2005-2006.

#### **4.4 Experimento IV. Inducción de organogénesis en tejido calloso de *Agave angustifolia* Haw.**

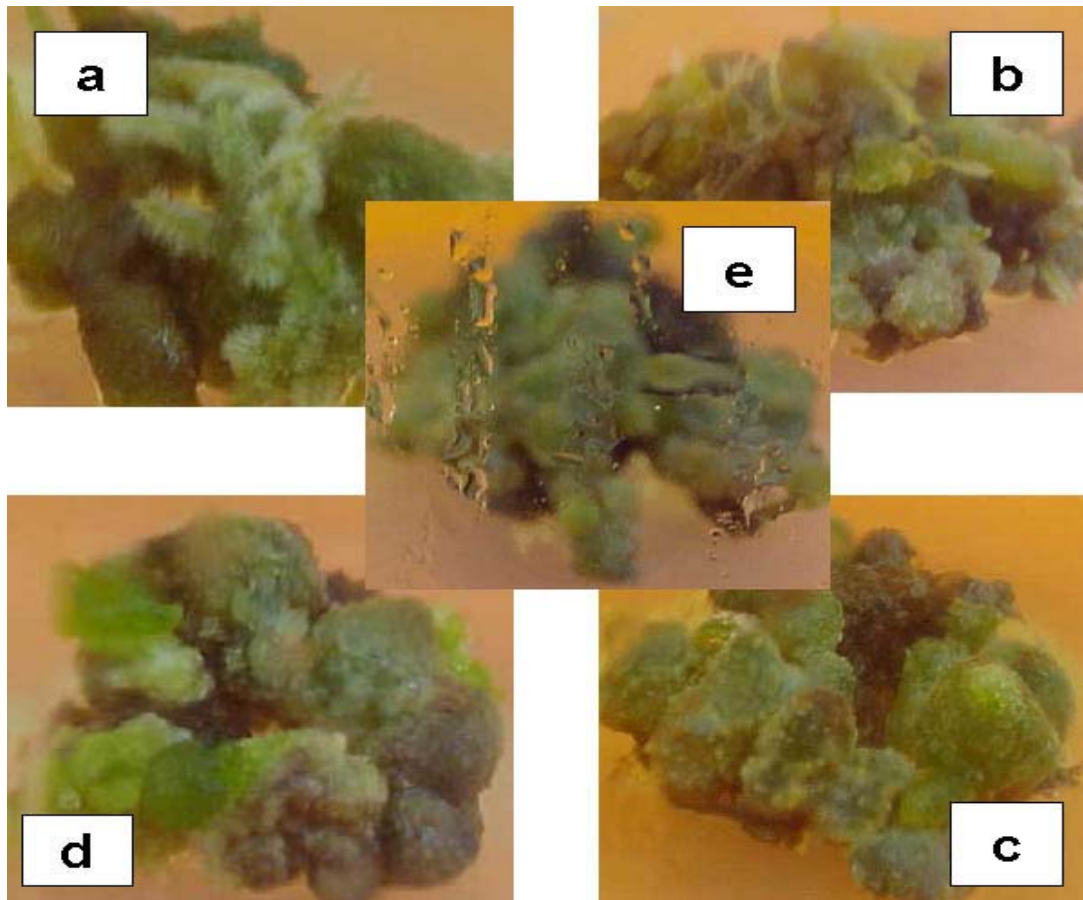
En esta etapa se logró la inducción de organogénesis sobre tejido calloso, tomando como material vegetal los callos obtenidos en etapa de inducción de callo, en un medio con diferentes concentraciones de citocinina (BA) y sin auxina (figura 11).



**Figura 11.** Inducción de organogénesis sobre tejido calloso de *Agave angustifolia* Haw. ITSON 2005-2006.

Según los resultados analizados estadísticamente se encontró que existe diferencia altamente significativa para el diámetro del callo entre semanas y entre tratamientos para el diámetro de callo con interacción (tabla 14, anexo 2). Por lo tanto se realizó la prueba  $t$  con una significancia 0.05, tabla 15, anexo 2, destacándose una DMS de 0.1024, la mejor semana para la organogénesis es la cuarta. En los resultados obtenidos, en la prueba de  $t$ , con una significancia 0.05, DMS 0.1024, los mejores tratamientos son: (3) 5 mg/l BA, (4) 7.5 mg/l BA y (5) 10 mg/l BA son iguales ver tabla 16 (anexo 2).

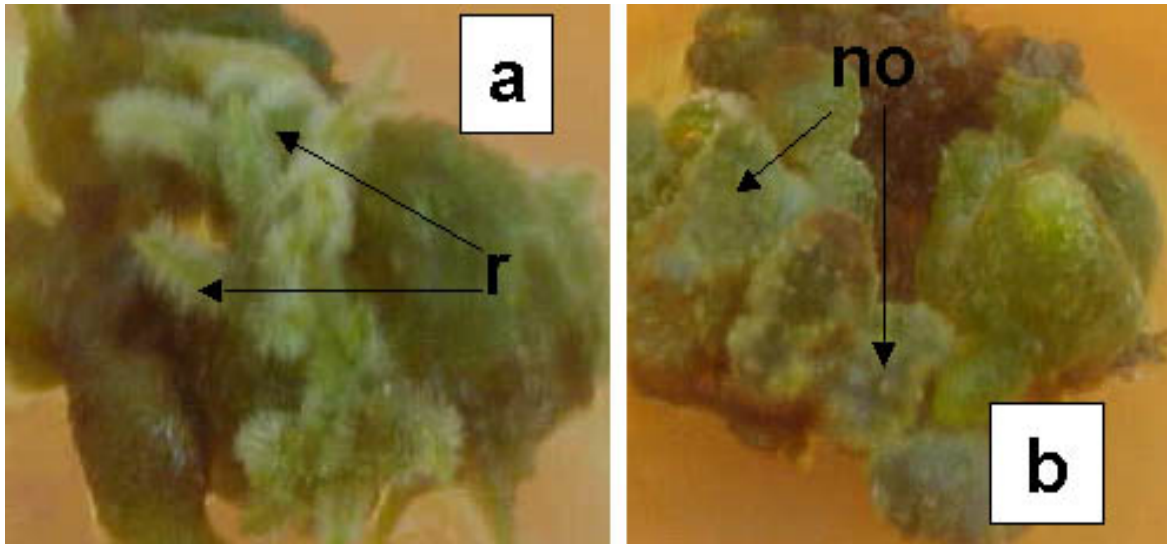
Estadísticamente podemos observar en la tabla 17 ver anexo 2, con una significancia de 0.05, DMS 0.0939, se observa que todos los tratamientos en la primer semana son iguales y en la segunda, tercera y cuarta semana los mejores resultados se obtuvieron en el tratamientos (5) 10 mg/l y (4) 7.5 mg/l BA (figura 12).



**Figura 12.** Organogénesis *in vitro* de *Agave angustifolia* Haw. De los 5 tratamientos: (a) 10 mg/l BA, (b) 0 mg/l BA, (c) 2.5 mg/l BA, (d) 7.5 mg/l BA y (e) 5 mg/l BA. Todas muestran estructuras globulares verdes (nódulos) y la figura (a) muestra raíces (rizogénesis). ITSON 2005-2006.

En este experimento inducción de organogénesis se puede decir que el tratamiento 10 mg/l BA, es el mejor tratamiento porque dio el mayor diámetro de callo, además de presentar presencia de nódulos verdes y formación de raíces como se observan en la figura 13, la contaminación y la oxidación fue nula en todos los tratamientos.





**Figura 13.** Organogénesis *in vitro* de *Agave angustifolia* Haw,. Formación de raíces (r) rizogénesis (a); Formación de estructuras globulares verdes (no) nódulos (b). ITSON 2005-2006.

Para la inducción de organogénesis sobre tejido calloso como material vegetal, se tomo como referencia a Yépez *et al.*, 2002, donde se utilizó un medio de cultivo con BA en concentración de 10 mg/l en ausencia de auxina, para inducir organogénesis a través de tejido calloso obteniendo brotes. En observaciones preliminares a este estudio, se vio que la posterior aparición de brotes se relaciona con la presencia de nódulos verdes en los callos (Yépez, 1998, citado por Yépez *et al.*, 2002).

Se ha inducido la regeneración de brotes a partir de regiones nodulares de color verde sobre explantes de rizoma de *A. sisalana* en presencia de la citocinina BA (Das, 1992; Yépez *et al.*, 2002). En observaciones preliminares a este estudio, la posterior aparición de los brotes también se ha mostrado relacionada con la presencia de nódulos verdes en los callos.

**CONCLUSIONES**

- La desinfección es factible en cualquiera de los tratamientos utilizados en la presente investigación, pero se recomienda el Hipoclorito de Sodio al 5%, con un tiempo de exposición de 25 minutos.
- La inducción de tejido de callo en *Agave angustifolia* Haw, es posible a partir de secciones de hojas de la planta (hijuelos).
- La formación de callo sobre tejido de hoja se logra utilizando dosis de auxina 1.5 mg/l (2,4-D) y citocinina de 1 mg/l (BA).
- La organogénesis indirecta fue exitosa a partir de tejido de callo mostrando estructuras globulares verdes (nódulos), en presencia de concentración de 10 mg/l de BA, sin auxinas.

---

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Ayerbe, L. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 37, 57, 78, 121-125, 214, 220.
- Bidwell, G. 1979. Fisiología vegetal. Editorial-AGT Editor, S.A. México. pp 138, 149.
- Blanco, M., Valverde R. y Gómez L. 2004. Micropropagación de *Dracaena deremensis* va. *Janet Craig*. Agronomía Costarricense 28(1): 07-15.
- CIANOBIO. 2003. Conservación *in situ* y manejo campesino de magueyes mezcaleros (Ver <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/Infv028.pdf>).
- CONACYT. 2003. Desarrollo sustentable del cultivo de *Agave angustifolia* para la producción de Bacanora en Sonora. (Modalidad a, b) (Ver <http://www.conacyt.mx/fondos/sonora/2003-02/demandasespecificas-sonora2003-02.doc>).
- CONAFOR. (S.f.). Comisión Nacional de forestación. *Agave angustifolia* Haw. (Ver <http://www.conafor.gob.mx/portal/index.php?s1=6&s2=6>).
- Garcés, M. 2003. Desarrollo de las primeras etapas de un protocolo de micropropagación para *Eriosyce aurata* (Pfeiffer) *Backeberg* (cactaceae), una especie en estado de conservación vulnerable endémica de Chile. Tesis de

- Magíster en Ciencias Agropecuarias. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago-Chile. 6 Pág.
- García, E., y Margarita R. 1989. Control de la oxidación y combinación en microesquejes de café (*caffea arabica* "CATIMOR") cultivados *in vitro*. Agronomía tropical. 40: 249-268. Universidad de Venezuela Facultad de Ciencias. Apdo. 47114. Caracas 1080. Venezuela.
- Gómez, A. 1999. Establecimiento aséptico y determinación del explante óptimo para la micropropagación de la planta ornamental *Diefrenbachia maculata*. Tesis de Ingeniero Biotecnólogo. Instituto tecnológico de Sonora. Cd. Obregón Son. México. pp. 9,10.
- Gómez, P., Aranda, E., Márquez, J. y Castillo, P. 2003. Estudio anatómico comparativo de cultivos callogenéticos de *Ipomoea murucoides roem. et Schult (convolvulacea)* utilizando diferentes fitoreguladores. Presentado en el X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- Granados, D. 1999. Los Agaves en México. ISBN6) 281-968-884-225-7. Universidad Autónoma de Chapingo, México. pp 11, 64-73, 78-81, 173.
- Gurrola, M. 2005. Obtención de células callosas del árbol palo fierro (*olneya tesota*) a partir de hipocotilo. Título de Ingeniero Biotecnólogo. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora. pp 32, 33
- Hurtado, M., y Merino, M. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trillas. México. 42 Pág.
- Illesley, G. 2003. Conservación *in situ* y manejo de magueyes mezcaleros. Grupo de estudios ambientales A.C. 11 Pág.

- IMADES. 2002. (Ver <http://www.imades.org/entorno/entorno11/sabias.htm>).
- Imay, M. 1997. Establecimiento aséptico de *Syngonium podophyllum* en medio de cultivo comercial. Tesis de Ingeniero Biotecnólogo. Instituto tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora México. 49 Pág.
- INGENIEROS AGRÓNOMOS PARASITÓLOGOS, A.C., 2003. Sensibilidad de *Erwinia caratovora subsp. atroseptica* y *Xanthomonas vesicatoria*. a antibióticos agrícolas “*in vitro*”. Conferencia Panamericana de Fitopatología. Texas, USA. (Ver <http://www.agromail.com.mx/boletin2.html>).
- Lara, Á. 2005. “Obtención de la huella genética de Agaves mezcaleros de San Luis Potosí por RAPD y AFLP”. Tesis de Maestría en Ciencias, IPICYT, San Luis Potosí, S.L.P. pp 7,10, 11, 12, 13,14.
- Malda, G., y Ruiz, María de la Luz. 2004. Comparación del crecimiento de magueyes pulqueros (*Agave salamiana otto ex. sam* y *Agave mapisaga Trel.*) bajo esquemas de propagación *in vitro* y condiciones de invernadero. Biología Script. Vol. 1. pp: 1-6.
- Mavares, Batís del Carmen. 2002. Efecto *in vitro* del fungicida flutolanil, sobre el control de dos cepas de *trichoderma sp* y una de *screrotina sclerotiorum* (Lib) Bary. TPG SB951.3M3.42002Universidad centro occidental Lisandro Alvarad (Ver [http://bibagr.ucla.edu/ve/cgiwin/be\\_alex.exe?Acceso=T070500042536/0&Nombrebd=bvetucla](http://bibagr.ucla.edu/ve/cgiwin/be_alex.exe?Acceso=T070500042536/0&Nombrebd=bvetucla)).
- Muños, Y., Pérez, A., Pérez, S., Sagrera M., y Pimentel, C. 2002. Metodología para el mejoramiento genético del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) con el empleo de técnicas biotecnológicas y radiomutagénicas. Instituto de Investigaciones Hortícola “*liliana Dimitrova*” (IIHLD).

- Nahuat, S., Giordana, J., y Santana, N. 2003. Efecto de diferentes antioxidantes en el control de la fenolización en el cultivo *in vitro* de orquídeas. Presentado en el X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, Jalisco, México.
- Nobel, S. 1998. Los incomparables agaves y cactus. Ed. Trillas. México. 12 Pág.
- Núñez, L. 2004 Estrategias para el desarrollo de la industria del bacanora. CIAD, ISBN 968-5862-00-1. Sonora México. pp.27, 97-103,123-130.
- Tamayo, A. 1998. Establecimiento Aséptico de *Echinocereus poselgeri* cactácea en peligro de extinción. Tesis de Ingeniero Biotecnólogo. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora, México. 63 Pág.
- Tineo, L. 1989. Cultivo *in vitro* de meristemos de clavel (*Dianthus caryophyllus* L. Tesis de Ingeniero Agrónomo Biotecnólogo. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora, México. 77 Pág.
- Pérez E., M., Ramírez, R., Núñez H., y Ochoa, N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. pp 16-19, 37-39.
- Pérez, F. y Martínez- Laborde, J. 1994. Introducción a la fisiología vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 44, 45, 51 – 53, 65, 104, 107.
- Pierik, R. 1990. Cultivo *in vitro* de plantas superiores. Editorial Mundi-Prensa, Madrid. pp 31-35.
- Yépez, L., García, E., y Vargas, E. 2002. Notas preliminares sobre la propagación clonal *in vitro* de *Agave cocui* Trelease. CROIZATIA 2(3): 187-194.

**Citas en Internet**

<http://dana.ucc.nau.edu/~md276/pictures/agave-sideview.gif>

[http://www.fotomas.com/tequila\\_futures.htm](http://www.fotomas.com/tequila_futures.htm)

<http://www.acamextequila.com.mx/noflash/elagave/anatomia.gif>

[http://www.umanitoba.ca/afs/plant\\_science/COURSES/39768/I15/embryogenesis.gif](http://www.umanitoba.ca/afs/plant_science/COURSES/39768/I15/embryogenesis.gif)

<http://www.funflc.org.ve/webfunda/programas/agave/croi4>

[http://elportaldemexico.com/bebidas/mezcales\\_y\\_tequilas.htm9](http://elportaldemexico.com/bebidas/mezcales_y_tequilas.htm9)

## ANEXOS

**Anexo 1.** Cuadro de Soluciones concentradas de las sales inorgánicas del medio de Murashige y Skoog (1962).

Compuesto	Solución Conc. 100 X (g/l)	* Vol. en (ml)
1. NITRATOS:		
Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ )	165.000	10
Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )	190.000	
2. SULFATOS		
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1.690	10
Sulfato de maganeso ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	0.860	
Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.0025	
3. HALÓGENOS		
Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	44.00	10
Yoduro de potasio (KI)	0.083	
Cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.0025	



---

4. $P_0_4$ , $BO_3$ , $MoO_4$		
Fosfato de potasio ( $KH_2PO_4$ )	44.000	10
Acido bórico ( $H_3BO_3$ )	0.620	
Molibato de sodio ( $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ )	0.025	
5. NaFeEDTA	2.784	10
Sulfato ferroso ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	3.724	
Acido Etilen-dinitro-tetra acetato disódico ( $Na_2$ -EDTA)		

---

\* Volumen que debe utilizarse para preparar un litro de medio de cultivo.

Fuente:(Murashige, T. y F. Skoog. 1962)

## Anexo 2. Análisis Estadísticos.

### Análisis de la varianza para el efecto del hipoclorito de sodio y los desinfectantes comerciales.

**Tabla 7.** Efecto del hipoclorito de sodio en dos tiempos de exposición, flutolanil (Moncut) y Sulfato de gentamicina con clorhidrato de oxitetraciclina (Bactrol) en explantes de hoja de *Agave angustifolia* Haw.

Causas de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F(calc)	F(1.05)	F(0.01)
Tratamientos	3	1,5	0,5NS	3	3,86	6,99
Repeticiones	3	0,5	0,16666667NS	1	3,86	6,99
Error	9	1,5	0,16666667			
<b>Total</b>	<b>15</b>	<b>3,5</b>				

**Análisis de la varianza para diámetro de callo entre los tratamientos y semanas (utilizando dosis de 2,4-D (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l), y BA (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l)).**

**Tabla 8.** ANOVA. Efecto del diámetro de callo entre los tratamientos y las semanas en explantes de hoja de *Agave angustifolia* Haw.

Causa de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F(Calc)	P>F
REPETICIONES	4	1.779179	0.444795	7.0699	0.004
FACTOR A	3	16.360031	5.453344**	86.6799	
ERROR A	12	0.754963	0.062914		
FACTOR B	24	11.402267	0.475094 **	3.8851	0.000
INTERACCION	72	4.634140	0.064363	0.5263	0.999
ERROR B	384	46.957352	0.122285		
TOTAL	499	81.887932			

C.V. (ERROR B) = 10.7

**Tabla 9.** Significancia al 0.05. Muestra las medias del factor A (diámetro de callo entre las semanas).

Tratamientos Semanas	Medias A	Significancia 0.05
4	0.4723	a
3	0.4002	a
2	0.3435	ab
1	0.0000	b

**DMS= 0.3457**

**Tabla 10.** Prueba de  $t$ , con una significancia 0.05. Muestra las medias del Factor B (diámetro de callo entre los tratamientos).

No.	Tratamientos ( 2,4-D, BA) mg/l	Medias B	Significancia 0.05
14	(1.5, 1.0)	0.605	a
7	(0.5, 0.5)	0.5675	ab
3	(1.0, 0.0)	0.4485	abc
2	(1.5, 0.0)	0.425	abcd
9	(1.5, 0.5)	0.41	abcd
12	(0.5, 1.0)	0.3325	abcd
13	(1.0, 1.0)	0.325	abcd
6	(0.0, 0.5)	0.2815	abcd
10	(2.0, 0.5)	0.27	abcd
11	(0.0,1.0)	0.255	abcd
8	(1.0, 0.5)	0.25	abcd
15	(2.0, 1.0)	0.2475	abcd
19	(1.5, 1.5).	0.2475	abcd
20	(2.0, 1.5)	0.235	abcd
1	(0.0, 0.0)	0.2175	abcd
24	(1.5, 2.0)	0.215	abcd
5	(2.0, 0.0)	0.1875	abcd
25	(2.0, 2.0 )	0.1825	abcd
4	(1.5, 0.0)	0.165	bcd
17	(0.5, 1.5)	0.1575	bcd
18	(1.0, 1.5)	0.1575	bcd
21	(0.0, 2.0)	0.105	cd
16	(0.0, 1.5)	0.0825	cd
22	(0.5, 2.0)	0	d
23	(1.0, 20)	0	d

**DMS= 0.4335**

**Análisis de la varianza para diámetro de callo entre los tratamientos y semanas (utilizando dosis de 2,4-D (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l), y BA (0.0, 0.5, 0.1, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l)).**

**Tabla 11.** ANOVA. Efecto del diámetro de callo entre los tratamientos y las semanas en explantes de hoja de *Agave angustifolia* Haw.

Causas de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F(Calc)	P>F
REPETICIONES	4	5.766243	1.441561	7.6756	0.003
FACTOR A	3	4.853905	1.617968	8.6149	0.003
ERROR A	12	2.253725	0.187810		
FACTOR B	24	11.798437	0.491602	6.8853	0.000
INTERACCION	72	6.213125	0.086293	1.2086	0.135
ERROR B	384	27.417158	0.071399		
TOTAL	499	58.302593			

C.V. (ERROR B) = 12,819

**Tabla 12.** Significancia al 0.05. Muestra las medias del factor A (diámetro de callo entre las semanas).

Factor A (Semanas)	Medias A	Tratamientos A	Medias A	0.05
1Semana	0.000000	4	0.2609	a
2 Semana	0.176479	3	0.2130	a
3 Semana	0.212978	1	0.1765	b
4 Semana	0.260895	2	0.0000	b

**DMS= 0.5972**

**Tabla 13.** Prueba de  $t$ , con una significancia 0.05. Muestra los promedios del diámetro de callo entre los tratamientos.

<b>No.</b>	<b>Tratamientos ( 2,4-D, BA) mg/l</b>	<b>Medias B</b>	<b>Significancia 0.05</b>
7	(0.25, 0.25)	0.6275	a
9	(0.75,0.25)	0.48	b
15	(1.0, 0.5)	0.32	bc
25	(1.0, 1.0)	0.291	bc
23	(0.5, 1.0)	0.2375	bc
18	(0.5, 0.75)	0.2365	bc
21	(0.0, 1.0)	0.21	bc
8	(0.5, 0.25)	0.195	bc
13	(0.5, 0.5)	0.195	bc
4	(0.75, 0.0)	0.1935	bc
22	(0.25, 1.0)	0.1825	bc
10	(1.0, 0.25)	0.1	c
11	(0.0, 0.5)	0.0875	c
14	(0.75, 0.5)	0.075	c
3	(0.5, 0.0)	0.0725	c
19	(0.75, 0.75)	0.0375	c
5	(1.0, 0.0)	0.035	c
1	(0.0, 0.0 )	0	c
2	(0.25, 0.0)	0	c
6	(0.0, 0.5)	0	c
12	(0.25, 0.5)	0	c
16	(0.0, 0.75)	0	c
17	(0.25, 0.75)	0	c
20	(1.0, 0.75))	0	c
24	(0.75, 1.0)	0	c

**DMS= 0.3312**

**Análisis de la varianza para el diámetro de callo (o nódulos) entre los tratamientos y las semanas.**

**Tabla 14.** ANOVA Efecto del diámetro de callo entre tratamientos y las semanas en explantes de hoja de *Agave angustifolia* Haw.

Causas de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	F(calc)	P>F
REPETICIONES	4	0.105461	0.026365	4.7742	0.016
FACTOR A	3	4.931190	1.643730**	297.6472	0.000
ERROR A	12	0.066269	0.005522		
FACTOR B	4	0.551476	0.137869**	24.9096	0.000
INTERACCION	12	0.441483	0.036790	6.6471	0.000
ERROR B	64	0.354225	0.005535	0	
TOTAL	99	6.450104			

C.V. (ERROR B) = 8.79%

**Tabla 15.** Prueba de  $t$ , con un nivel de significancia (0.05). Muestra las medias del Factor A (diámetro del callo entre las semanas), tratamientos (semanas).

Factor A (Semanas)	Medias A	Tratamientos A	Medias A	0.05
1Semana	0.711000	4	1.23000	<b>a</b>
2 Semana	0.699000	3	0.7462	<b>b</b>
3 Semana	0.746500	1	0.7110	<b>b</b>
4 Semana	1.230000	2	0.6990	<b>b</b>

**DMS= 0.1024**

**Tabla 16.** Prueba de *t*, con un nivel de significancia (0.05). Muestra las medias del Factor B (diámetro de callo entre los tratamientos).

Factor B BA mg/l	Medias B	Tratamientos B	Medias B	0.05
1.(0)	0.730250	5	0.9225	<b>a</b>
2.(0.25)	0.792500	4	0.9150	<b>a</b>
3.(0.5)	0.872500	3	0.8725	<b>ab</b>
4.(0.75)	0.875200	2	0.7925	<b>bc</b>
5.(10.0)	0.922500	1	0.7303	<b>c</b>
<b>DMS= 0.0939</b>				

**Tabla 17.** Prueba de *t*, con un nivel de significancia (0.05). Muestra las medias del Factor B (diámetro de callo entre los tratamientos), tratamientos (BA mg/l)

Factor B BA mg/L	SEMANA 1				SEMANA 2				SEMANA 3				SEMANA 4			
	Medias B	Trat. B	Medias B	0.05	Trat. B	Medias B	0.05	Trat. B	Medias B	0.05	Trat. B	Medias B	0.05			
1 (0)	0.730250	5	0.7400	<b>a</b>	5	0.7400	<b>a</b>	5	0.7400	<b>a</b>	5	1.4200	<b>a</b>			
2 (0.25)	0.792500	4	0.7350	<b>a</b>	4	0.7350	<b>a</b>	4	0.7350	<b>a</b>	4	1.4000	<b>a</b>			
3 (0.5)	0.872500	3	0.7200	<b>a</b>	3	0.7200	<b>ab</b>	3	0.7200	<b>ab</b>	3	1.2800	<b>b</b>			
4 (0.75)	0.872500	1	0.7000	<b>a</b>	2	0.6600	<b>ab</b>	2	0.6600	<b>ab</b>	2	1.1300	<b>c</b>			
5(10.0)	0.922500	2	0.6600	<b>a</b>	1	0.6460	<b>b</b>	1	0.6460	<b>b</b>	1	0.9200	<b>d</b>			
<b>DMS= 0.0939</b>																

---

---

**ABREVIATURAS Y GLOSARIO**

<b>ANA</b>	ácido naftalenacético
<b>BAP</b>	bencilaminopurina
<b>°C</b>	grados Celsius
<b>2,4-D</b>	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b>EDTA</b>	ácido etilendiamino tetraacético
<b>mg/l</b>	miligramos por litro
<b>MS</b>	Murashige y Skoog (1962)

**Adventicio:** Desarrollo de órganos (raíces, yemas, vástagos, flores, etc.) o embriones (estructuras de tipo embrionario), a partir de zonas poco usuales, incluyendo células callosas. Si los órganos se originan a partir de las células iniciales, primordios, etc., o los embriones se desarrollan a partir de cigotos, el término adventicio no puede ser usado.

**Agar:** Un producto de origen vegetal (obtenido a partir de algas), que se utiliza para solidificar medios nutritivos.

**Agua destilada:** Agua producida por destilación, que no contiene compuestos orgánicos o inorgánicos.

**Alcohol.** Alcohol etílico ( $C_2H_5OH$ ), también llamado etanol.



**Aminoácidos:** Grupo de compuestos orgánicos que, aparte de otras funciones, son los constituyentes básicos de las proteínas.

**Androgénesis:** Partenogénesis masculina. Desarrollo de un individuo haploide a partir de un grano de polen.

**Antioxidantes:** Grupo de sustancias químicas que impide la oxidación, por ejemplo, la vitamina C o el ácido cítrico.

**Antiséptico:** Que contrarresta la infección, especialmente previniendo el desarrollo de microorganismos.

**Ápice del vástago:** Meristemo del vástago, apical terminal, o lateral que contiene algunos primordios foliares u hojas.

**Asepsia:** Ausencia de microorganismos.

**Aséptico:** Libre de cualquier microorganismo (hongos, bacterias, levaduras, virus, micoplasmas, etc.), estéril.

**Autoclave:** Aparato en el cual se esterilizan, por medio de vapor a presión, los medios nutritivos, instrumental de vidrio, etc.

**Autótrofo:** que no requiere sustancias orgánicas.

**Auxinas:** Grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas), que producen elongación celular, y en algunos casos división celular; frecuentemente inducen la aparición de raíces adventicias e inhiben el desarrollo de yemas adventicias (en los vástagos).

**Axénico:** Aislado de otros organismos.

**Axilar.** Que se origina en las axilas de las hojas.

**Biosíntesis:** Síntesis de compuestos por la planta o por células.

**Bisturí:** Cuchilla pequeña y afilada de uso quirúrgico.

**Caja de Petri:** Plato redondo y plano, fabricado de vidrio o material sintético, provisto de tapa.

**Células callosas:** Tejidos no organizados, formados por células diferenciadas y no diferenciadas, que se dividen de forma activa y que generalmente se originan en zonas dañadas (por heridas), o en cultivo de tejidos.

**Cámara de cultivo:** Cámara para el mantenimiento de cultivos, con luz, temperatura y humedad controladas.

**Cámara de flujo laminar:** Cámara para inoculación, que se mantiene estéril por medio de un flujo no turbulento y continuo de aire estéril.

**Cambium:** Tejido capaz de dividirse y que en los tallos origina la corteza y la madera.

**Carbohidratos:** Grupo de compuestos que sirven como fuente de energía (por ejemplo glucosa, sacarosa, fructosa, etc.).

**Citocininas:** Grupo de hormonas vegetales (naturales o sintéticas), que inducen la división celular y frecuentemente la formación de yemas adventicias (en vástagos). En la mayor parte de los casos inhiben la formación de raíces adventicias. Las citocininas disminuyen la dominancia apical.

**Clon:** Grupo de células, tejidos o plantas que son en principio genéticamente idénticas. Un clon no tiene por qué ser necesariamente homogéneo.

**Cultivo de embriones:** Cultivo de embriones sobre medio nutritivo.

**Cultivo de órganos:** Cultivo de órganos *in vitro*, de tal forma que permite el desarrollo y/o conservación del órgano aislado originalmente.

**Cultivo de tejidos:** Cultivo de protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones o semillas *in vitro*.

**Cultivo en suspensión:** Cultivo en el que las células aisladas y/o agregados celulares crecen y se multiplican, suspendidos en un medio líquido.

**Cultivo primario:** Cultivo que se obtiene a partir de células, tejidos u órganos obtenidos de un organismo.

**Desarrollo:** Ciclo de semilla a semilla en una planta, o desde la iniciación de los órganos hasta la senescencia; también los cambios en la forma de la planta debidos al crecimiento y la diferenciación.

**Desdiferenciación de células:** Conversión de células diferenciadas en no diferenciadas (meristemáticas).

**Detergente:** Sustancia que rebaja la tensión superficial de una solución; se añade para mejorar el contacto entre las plantas y los agentes esterilizantes.

**Diferenciación:** El desarrollo de células o tejidos con una función específica y/o la regeneración de órganos o estructuras orgánicas (raíces, vástagos, etc.) o proembriones.

**Diploide:** Un núcleo es diploide si contiene dos veces el número básico (x) de cromosomas. La fórmula de su genoma es  $2n = 2x$ .

**Dominancia apical:** Fenómeno por el que la yema terminal de un vástago impide el crecimiento de las yemas axilares.

**EDTA:** Acido etilendiamino tetraacético, compuesto quelante al cual el hierro queda unido de tal manera, que es asimilable por la planta.

**Embriogénesis:** Proceso por el cual un embrión se desarrolla a partir de una célula huevo, o asexualmente a partir de una o un grupo de células.

**Estéril:** Medio u objeto que no contiene microorganismos perceptibles o viables. Son necesarias pruebas de esterilidad para comprobación.

**Esterilización:** Procedimiento para la eliminación de microorganismos.

**Esterilizar.** Eliminación de microorganismos, como, por ejemplo, por medio de sustancias químicas, calor, irradiación o filtración.

**Explante:** Una porción de tejido escindida, u órgano tomado de la planta, para iniciar un cultivo.

**Fase juvenil:** Período de la vida de una planta durante el cual no se puede inducir la floración. Durante la fase juvenil las plantas presentan frecuentemente características muy especiales (morfológicas, fisiológicas, etc.), que son diferentes de las de la fase adulta.

**Flameado:** Técnica de esterilización, que consiste en bañar una porción de un instrumento en alcohol, haciéndolo arder posteriormente.

**Formación de órganos (organogénesis):** Formación de una raíz, vástago, yema, flor, tallo, etc.

**Habitación:** Fenómeno por el que, después de un número de subcultivos, las células pueden crecer sin la adición de hormonas, aunque éstas eran necesarias al principio.

**Heterótrofo:** Que requiere sustancias orgánicas.

**Inducción:** Iniciación de un proceso particular, con el resultado del desarrollo de órganos (raíces, vástagos, flores).

**Inocular:** Poner en o sobre un medio nutritivo.

**In vitro:** Literalmente "en vidrio", en un tubo de ensayo, matraz, etc.

**In vivo: In situ.** Es la planta intacta tal y como crece en el invernadero, en el campo, etc.

**Macroelementos:** Grupo de elementos esenciales como N, P, K, Ca y Mg, que son necesitados normalmente en cantidades relativamente altas (nutrición inorgánica de la planta).

**Matraz Erlenmeyer:** Matraz de forma cónica y fondo plano.

**Medio nutritivo:** Mezcla de sustancias en las cuales pueden crecer células, tejidos u órganos, con o sin agar.

**Meristemo:** Conjunto de células en división en el ápice de la raíz o vástago (meristemo apical), en el cambium intercalar de las yemas, hojas y flores.

**Meristemo apical:** Grupo de células meristemáticas situadas en el ápice de la raíz o del vástago, que por división celular originan a las precursoras de los tejidos primarios de la raíz o el vástago.

**Meristemoide:** Nódulo de tejido indiferenciado, a partir del cual se pueden producir nuevas células y/o estructuras adventicias (como meristemos).

**Microelementos:** Grupo de elementos como el Fe, B, Zn, Mo, Mn, etc., que son importantes en cantidades relativamente pequeñas para la nutrición inorgánica de las plantas.

**Micropropagación:** Propagación vegetativa de plantas *in vitro*. Monocapa: Una única capa de células que crecen sobre una superficie.

**Morfogénesis:** Origen de la forma, y como consecuencia la diferenciación de características estructurales internas asociadas.

**Mutación:** Cambio genético.

**Partenogénesis:** Producción de un embrión a partir de un gameto femenino, sin la participación del gameto masculino

**Pecíolo:** tallo de una hoja

**pH:** Logaritmo de la concentración de iones hidrógeno cambiado de signo.

**Primordio:** Grupo de células que da origen a un órgano. Primordio de la hoja: Iniciales de una hoja.

**Regulador:** Sustancia que regula el crecimiento y desarrollo de células vegetales, órganos, etc.

**Repicar:** Trasplantar células, tejidos u órganos, de un medio nutritivo a otro.

**Termolábil:** Que no resiste el calor, p. e. una sustancia que se descompone cuando se calienta.

**Totipotencia:** Potencialidad de las células o tejidos para formar todo tipo de células y/o regenerar una planta.

**Tubo de ensayo:** Tubo en el cual se cultivan células, tejidos, etc.

**Variación somaclonal:** Incremento de la variabilidad genética en las plantas superiores, que tiene lugar en el cultivo *in vitro*.

**Vitaminas:** Grupo de compuestos orgánicos que a veces se añaden al medio nutritivo (vitamina B, vitamina C, etc.).