

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y**  
**AGROPECUARIAS**  
**DIVISION DE CIENCIAS AGRONOMICAS**



**METODO DE MICROPROPAGACION POR ORGANOGENESIS**  
**in vitro DE Agave tequilana WEBER VARIEDAD AZUL**

**TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION**

**QUE PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE:**

**INGENIERO AGRONOMO**

**QUE PRESENTA:**

**ERNESTO LOZANO MENDOZA**

**ZAPOCAN, JALISCO, 30 DE SEPTIEMBRE DE 2005.**



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS**  
**BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS**  
**CARRERA DE INGENIERO AGRONOMO**  
**COMITE DE TITULACION**

**M.C. SALVADOR MENA MUNGUIA**  
**DIRECTOR DE LA DIVISION DE CIENCIAS AGRONOMICAS**  
**PRESENTE**

Con toda atención nos permitimos hacer de su conocimiento, que habiendo sido aprobada la modalidad de titulación INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO, opción TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN, con el título:

**"MÉTODO DE MICROPROPAGACIÓN POR ORGANOGÉNESIS in vitro DE**  
**Agave tequilana , Weber. Variedad Azul"**

El cual fue presentado por él (los) pasante(s):

**ERNESTO LOZANO MENDOZA**

El Comité de Titulación, designó como director y asesores, respectivamente, a los profesores:

<b>M.C. MARTHA ISABEL TORRES MORÁN</b>	<b>DIRECTOR</b>
<b>M.C. MOISES MARTÍN MORALES RIVERA</b>	<b>ASESOR</b>
<b>M.C. RICARDO NUÑO ROMERO</b>	<b>ASESOR</b>

Una vez concluido el trabajo de titulación, el Comité de Titulación designó como sinodales a los profesores:

<b>DR. FERNANDO SANTACRUZ RUVALCABA</b>	<b>PRESIDENTE</b>
<b>DRA. MARIA LUISA GARCÍA SAHAGÚN</b>	<b>SECRETARIO</b>
<b>M.C. JOSEFINA LETICIA FREGOSO FRANCO</b>	<b>VOCAL</b>

Se hace constar que se han cumplido los requisitos que establece la Ley Orgánica de la Universidad de Guadalajara, en lo referente a la titulación, así como el Reglamento del Comité de Titulación.

**ATENTAMENTE**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Zapopan, Jal. a 27 de septiembre de 2005.

**M.C. SALVADOR GONZÁLEZ LUNA**  
**PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACIÓN**

**DRA. MARIA LUISA GARCÍA SAHAGÚN**  
**SECRETARIO DEL COMITE DE TITULACIÓN**

## AGRADECIMIENTOS

Mi mas sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron para mi formación personal y profesional.

A DIOS.

Por permitirme completar una etapa más de mi vida.

A MIS PADRES.

Por el apoyo moral y económico que me brindaron, por sus esfuerzos, sacrificios, cuidados, orientación y consejos.

A Mi Padre Jesús Lozano Vizcaíno

A Mi Madre Maria Guadalupe Mendoza Mercado.

A MIS HERMANOS.

Por convivir y compartir las diferentes etapas y momentos de nuestras vidas.

Para Humberto, Jesús, Mario y José Guadalupe Lozano Mendoza.

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

Al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias y a la Facultad de Agronomía, por darme la oportunidad de adquirir los conocimientos para ser una mejor persona y profesionista.

A MIS MAESTROS

Con Infinita gratitud por su ayuda, por compartir sus conocimientos y experiencias, dedicación, paciencia y amistad que me brindaron en el transcurso de mi carrera académica.

M.C. Martha Isabel Torres Morán

M.C. Salvador González Luna

M.C. Salvador Mena Munguía

M. C. Santiago Sánchez Preciado

Dr. Eduardo Rodríguez Guzmán

## A MIS AMIGOS

Por su amistad incondicional, sus consejos, sus compañías y apoyos recibidos en el transcurso de las diferentes etapas de nuestras vidas.

M.C. Moisés Martín Morales Rivera

M.C. Ricardo Nuño Romero

Ing Jorge Munguia Castellanos

Ing. Alberto F. Martínez Camacho

Ing. Francisco Naranjo Meza

Ing. Alfredo Monroy Vivanco

Ing. José Luis Olague Castillo

Ing. Javier Nuño Romero

Ing. Carlos M. Macias Arias

Ing. Carlos Torrecillas Martínez

Ing. Alberto Rivera Chávez

Ing. Rogelio Chávez García.

Este trabajo profesional fue realizado con esfuerzo y dedicación para:

Dios, mis Padres, Hermanos, Maestros y Amigos.

A todos y cada uno de ellos, muchas gracias por todo lo que me han ayudado y apoyado, para lograr una meta mas en mi vida.

# INDICE

INDICE DE CUADROS.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO.....	2
2. MICROPROPAGACIÓN.....	3
ELECCIÓN DEL EXPLANTE.....	3
DESINFECCIÓN DEL EXPLANTE.....	3
MEDIOS DE CULTIVO.....	4
IMPORTANCIA DEL PH EN LOS MEDIOS DE CULTIVO IN VITRO.....	6
SUPLEMENTOS NO DEFINIDOS.....	7
AGENTES GELIFICANTES.....	7
REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	7
3. FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO Y MORFOGÉNESIS IN VITRO.....	9
VARIACIÓN SOMACLONAL.....	10
4. MÉTODO DE MICROPROPAGACIÓN DE AGAVE TEQUILANA WEBER VARIEDAD AZUL ....	12
SELECCIÓN EN CAMPO DE FENOTIPOS DESEABLES.....	12
ESTABLECIMIENTO IN VITRO.....	13
TRATAMIENTO DE DESINFECCIÓN.....	13
PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO .....	16
5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRE .....	17
MACRONUTRIENTES MS (MURASHIGE Y SKOOG, 1962) .....	17
MICRONUTRIENTES MS (MURASHIGE Y SKOOG, 1962) .....	18
SOLUCIÓN MADRE DE VITAMINAS.....	20
PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MADRE DE CLORURO DE CALCIO.....	21
PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN MADRE DE FE EDTA.....	21
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRE DE REGULADORES DE CRECIMIENTO.....	21
PREPARACIÓN DE CONCENTRADO DE MEDIO CULTIVO .....	23
PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO .....	25
6. FASE DE PROPAGACIÓN CONSTANTE.....	29
7. PREPARACIÓN A LA ACLIMATACIÓN.....	35
8. TRANSFERENCIA A INVERNADERO.....	37
9. FASE DE VIVERO.....	39
10. CONCEPTOS UTILIZADOS EN LA MICROPROPAGACIÓN .....	41
11. RIESGOS Y FALLAS EN EL PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN .....	43
12. BIBLIOGRAFÍA.....	46

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág.
1	Elementos utilizados para preparar 1 litro de solución madre de macronutrientes MS.	17
2	Elementos utilizados para preparar solución madre de macronutrientes MS.	18
3	Elementos utilizados para preparar solución madre de micronutrientes MS	19
4	Elementos utilizados para preparar solución madre de vitaminas	20
5	Cantidades necesarias de soluciones madre para preparar concentrado de medio de cultivo MS.	23

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Titulo	Pag.
1	Diferentes tipos de explantes para iniciar cultivos <i>in vitro</i> (Lindsey y Jones, 1989)...	9
2	Campo cultivado con <i>A. tequilana</i> Weber variedad azul, certificado por el Consejo Regulador del Tequila.....	12
3	Hijuelos de <i>A. tequilana</i> , con diferentes tamaños de tallo.....	12
4	Preparación de un hijuelo de <i>A. tequilana</i> para establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> . A. Eliminación de las hojas más grandes. B. Corte del tallo.....	13
5	Campanas de flujo laminar.....	13
6	Desinfección de los explantes en una solución de cloro.....	14
7	Corte del tejido dañado por el tratamiento de desinfección con cloro.....	14
8	Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i> , en medio de cultivo estéril.....	15
9	Esquema de la preparación de soluciones madre, concentrado y medio de cultivo....	16
10	A. Balanza granataria B. Nivelación de la balanza con nivel de burbuja.....	17
11	A. Espátulas para pesado de sales y componentes del medio. B. Pesado en balanza analítica.....	19
12	Solución madre de vitaminas congeladas para su almacenamiento.....	20
13	Afore de las soluciones ajustando el volumen con piseta.....	22
14	Soluciones madre para la preparación de concentrado de medio de cultivo.....	24
15	Placa de agitación y vaso de precipitado para preparar soluciones.....	24
16	Adición de las soluciones stock para preparación de concentrado.....	25
17	Concentrado de medio MS en congelación para su almacenamiento.....	25
18	Adición de los reguladores de crecimiento con micropipeta.....	26
19	Afore de la solución del medio de cultivo.....	26
20	Medición y ajuste del pH.....	27
21	Pesado del agar.....	27
22	A. Adición del agar al medio B. Licuado del agar.....	27
23	Distribución del medio en contenedores.....	28
24	A. Autoclave B. Acomodo de los contenedores dentro de la autoclave para su esterilización.....	28
25	Extracción de brotes en Campana de flujo laminar.....	30
26	Separación de brotes en Campana de flujo laminar con bisturí y pinzas sobre caja de petri.....	31
27	Producción de brotes por yemas axilares.....	31
28	Resiembra de brotes en Campana de flujo laminar en condiciones asépticas.....	32
29	Sellado de contenedores con película plástica (Kleen pack) en Campana de flujo laminar.....	32
30	Incubador con luz, temperatura y humedad controladas.....	33
31	Esquema de la selección de brotes en un programa de micropropagación.....	34
32	Brotos individualizados para su enraizamiento.....	35
33	Brotos individualizados y sembrados en el medio de raizamiento.....	36
34	Enraizamiento de brotes en medio de cultivo.....	36
35	Lavado de raíces para su transferencia a sustrato en invernadero.....	37
36	Charolas con plantas de <i>A. tequilana</i> en su fase de adaptación en invernadero.....	37
37	Plantas en condiciones controladas de humedad relativa en invernadero.....	38
38	Plantas de <i>A. tequilana</i> en un vivero tecnificado (riego por goteo y acolchado).....	39
39	Vivero de plantas de <i>A. tequilana</i> producidas por cultivo de tejidos.....	40
40	Plantas de <i>A. tequilana</i> establecidas en campo.....	40
41	Cultivo contaminado por hongos.....	43
42	Oxidación del brote <i>in vitro</i> .....	44
43	Producción excesiva y senescencia de brotes.....	45
44	Vitrificación de los brotes <i>in vitro</i> .....	45

## RESUMEN

La micropropagación permite obtener numerosas plántulas de una sola célula o tejido y puede considerarse aporte biotecnológico en la solución de problemas agronómicos del *Agave tequilana* Weber variedad azul y que afectan el rendimiento del cultivo y tienen impacto tanto económico como social en el sector productivo de nuestro país.

Comparada con las prácticas tradicionales del cultivo del agave, la micropropagación puede presentar las siguientes ventajas:

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

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

El objetivo del presente trabajo es describir el proceso de micropropagación por organogénesis *in vitro* de *Agave tequilana* Weber variedad azul.

# 1. INTRODUCCIÓN

La Biotecnología vegetal, es una disciplina que tiene su fundamento en la célula que es la unidad básica de la vida y se define como: “La utilización de las plantas para la generación de bienes y servicios para el hombre”.

Dentro de la Biotecnología vegetal, se encuentra la micropropagación que es una técnica que permite obtener numerosas plántulas de una sola célula o tejido vegetal y es considerada actualmente, un aporte biotecnológico en la solución de los problemas agronómicos de muchas especies de importancia económica.

Las razones por las cuales se ha promovido la utilización de esta tecnología en la agricultura giran alrededor del concepto de dependencia del hombre a las plantas, por lo cual es comprensible que muchos de los esfuerzos en el desarrollo científico y tecnológico, vayan encaminados al mejor aprovechamiento de las mismas.

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

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

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

Utilizando métodos de micropropagación, pueden obtenerse individuos o clones genéticamente idénticos al material que les dio origen y eso tiene una aplicación a gran escala que es aprovechada a nivel industrial.

La micropropagación de la especie *Agave tequilana* puede ayudar a obtener plantas libres de enfermedades y facilitar la programación de las plantaciones.

Por otra parte, el mejoramiento genético que se ha tenido en esta especie ha sido muy escaso, debido a algunos problemas inherentes a la conformación morfológica y a los ciclos tan largos del cultivo, por lo que en este caso, la micropropagación también representa una gran ventaja.

### **OBJETIVO**

Describir el proceso de micropropagación por organogénesis *in vitro* de *Agave tequilana* Weber variedad azul.

## 2. MICROPROPAGACIÓN

### ***Elección del explante.***

El primer paso en el proceso de micropropagación, consiste en la elección del material con el que se va a iniciar el cultivo en el laboratorio. Para ello, deben observarse las características botánicas de la planta, que faciliten el proceso de producción de brotes o yemas que posteriormente se conviertan en una planta completa.

En el caso del agave, los trabajos que se han hecho permiten decidir que parte de la planta es la mejor o cual es el tejido competente (susceptible) para producción de brotes.

Se han utilizado diferentes partes del agave como explante. Mes *et al.* (1977), utilizó semillas para producción de callo, en un medio Linsmaier y Skoog.

Robert *et al.* (1987), reportó un método de micropropagación para *A. fourcroydes* que comenzó a partir de segmentos de tallo.

Torres-Morán (2005), utilizó como explante, hijuelos producidos por plantas de dos años. De estos hijuelos, se utilizaron los meristemas apicales obtenidos después de la eliminación de las hojas y parte del tallo hasta obtener un fragmento cilíndrico en donde se encontraba el meristemo.

Generalmente, se eligen las plantas madre por su estado de sanidad, porte y en el caso del agave tequilero, por su precocidad y acumulación de inulinas. También debe tomarse en cuenta que deben ser plantas vigorosas, sin ningún síntoma de enfermedad y que el tejido del explante sea joven y bien diferenciado.

### ***Desinfección del explante.***

Antes del establecimiento de un explante *in vitro* para iniciar una micropropagación, es importante tener presente que los tejidos colectados en el campo, están infestados externa y a veces también internamente con microorganismos, por lo cual es necesario realizar una desinfección que permita eliminar los microorganismos que se encuentran en forma superficial, ya que el medio de cultivo es muy atractivo para los microorganismos debido a la gran

cantidad de azúcares y minerales, aminoácidos, vitaminas y a las condiciones de temperatura y humedad a las que se maneja el cultivo.

La sustancia que se utilice como desinfectante, no debe ser tóxica para la planta, debe ser barata y fácil de manejar en condiciones asépticas. El material más comúnmente utilizado es el cloro comercial (hipoclorito de sodio).

Según Pierik (1987), la desinfección de los explantes se realiza de la siguiente manera:

Se sumerge el órgano en alcohol de 70% durante algunos segundos, para eliminar grasas (el alcohol de 96% resulta demasiado fuerte, produciendo una excesiva deshidratación).

Luego se realiza una esterilización durante 10-30 minutos en hipoclorito de sodio al 1% conteniendo algunas gotas de penetrante/surfactante tween 20 ó tween 80 que es un agente penetrante que disminuye la tensión superficial, permitiendo un mejor contacto superficial en concentraciones de 0.08-0.12%, después se enjuaga en agua corriente estéril (para eliminar el hipoclorito), generalmente se hacen tres enjuagues. Después de la desinfección, se elimina el tejido dañado por el cloro, este paso ya debe realizarse en condiciones asépticas o estériles (cámara de flujo laminar), utilizando instrumentos estériles (bañados en alcohol de 96% y después flameados).

### **Medios de cultivo**

Tal como sucede en el campo, *in vitro* son necesarios los elementos básicos para el desarrollo de la planta, esto es, deben estar disponibles como elementos el  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Mg}^+$  etc.

Los tejidos y células vegetales son desarrollados en medios artificiales suplementados con los nutrientes necesarios para su crecimiento y diferenciación, esto es:

- Sales inorgánicas
- Vitaminas
- Aminoácidos
- Carbohidratos
- Reguladores de crecimiento

- Agente solidificante (para los medios semisólidos)

Al igual que en condiciones normales, la carencia o exceso de alguno de estos elementos, afecta el desarrollo del cultivo *in vitro*.

Se han reportado muchos medios de cultivo que sirven para la micropropagación. Los más conocidos y utilizados son los de White (1939), Murashige y Skoog (1962), Gamborg (1967) y Schenk y Hildebrandt (1972); citados por George (1993).

Según Santacruz (2002), la importancia de los elementos que constituyen el medio de cultivo, puede definirse de la siguiente manera:

Nitrógeno. Participa en los procesos de morfogénesis, crecimiento y metabolismo y el balance de sus formas catiónicas es importante para evitar vitrificación. El catión  $\text{NH}_4^+$ , se absorbe más fácilmente en medios alcalinos y el anión  $\text{NO}_3^-$  en medios ácidos. Este elemento tiene un buen balance en el medio de Murashige y Skoog (1962) MS y este medio responde a necesidades de balance de muchas plantas.

La forma reducida de nitrógeno es también importante en la elaboración de los medios, está representada por los aminoácidos.

Fósforo. Se encuentra en compuestos que están presentes en la transferencia de energía dentro de las plantas. Forma parte de las proteínas. Actúa en la síntesis y estructura de los ácidos nucleicos. Regula el pH y el ambiente osmótico de las células.

Potasio. Proporciona consistencia a los tejidos. Participa activamente en el balance de iones en el medio de cultivo. Como el fósforo, regula el pH y el ambiente osmótico de las células. Una deficiencia produce pérdida de turgencia celular, flacidez de los tejidos e incremento de susceptibilidad a sequía.

Sodio. Este elemento es muy importante en el balance osmótico. También mantiene la turgencia de los tejidos y es indispensable para el crecimiento de la planta.

Magnesio. Es un componente esencial en la molécula de clorofila. Es requerido para la actividad de diferentes enzimas y es importante en el balance y

neutralización de los ácidos orgánicos (p. ejemplo, ácido málico, ácido succínico, ácido cítrico, etc.)

Azufre. Su absorción está ligada a la asimilación de nitrógeno. Ayuda en la síntesis de lípidos y en la regulación de la estructura de las proteínas. Su deficiencia da lugar a plantas rígidas, tallos quebradizos y delgados.

Cloro. En el caso del cultivo *in vitro*, es muy importante porque equilibra los cambios rápidos entre cationes  $K^+$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$ . Su deficiencia produce marchitamiento.

Manganeso. Tiene propiedades químicas similares a las del magnesio.

Boro. Es importante en el metabolismo de fenoles. Ayuda en la síntesis de lignina e interviene en el mantenimiento de la actividad meristemática.

Cobre y Molibdeno. Forman parte de enzimas y participan por lo tanto, en muchos procesos metabólicos.

Cobalto. Es un elemento componente de la vitamina B12 y es muy importante en la síntesis de ácidos nucleicos.

Níquel. Es componente de las enzimas ureasas.

Aminoácidos. Se adicionan para satisfacer requerimientos de N reducido, participan también en la morfogénesis, forman proteínas. Tienen el inconveniente de que en ocasiones deben ser muy específicos para algunas especies.

Vitaminas. Intermediarios esenciales e importantes en la catálisis metabólica. Se adicionan al medio como complemento de las ya producidas en los vegetales. Corrigen deficiencias en algunos factores.

### ***Importancia del pH en los medios de cultivo in vitro.***

Es responsable de la disponibilidad de los elementos en el medio de cultivo.

Según Butenko (1968), dependiendo del pH del cultivo, las auxinas se hacen menos estables, el agar pierde rigidez, algunas sales pueden precipitar y se retarda la absorción de amonio cuando el pH no se encuentra en un rango de 5.0 a 6.5 y esto frena el crecimiento del cultivo y en ocasiones lo impide.

### **Suplementos no definidos.**

Son sustancias que se han utilizado para promover el crecimiento de las plantas *in vitro* y que no constituyen elementos químicamente definidos. Como ejemplo, se tiene: extracto de levadura, jugos y extractos de fruta, agua de coco, extracto de papa, etc. Santacruz (2002).

### **Fuente de carbono.**

La principal fuente de carbono para los cultivos *in vitro*, son los azúcares, entre los cuales, el más empleado es la sacarosa que se hidroliza a glucosa y fructosa. Su hidrólisis a carbono, suple el carbono que la planta normalmente toma del ambiente en forma de CO<sub>2</sub> para utilizarlo en la fotosíntesis.

### **Agentes gelificantes.**

Son elementos que tienen la función de solidificar el medio de cultivo para dar soporte a los explantes y para mantener un equilibrio en la disponibilidad de humedad para los mismos. Su funcionalidad esta basada en el incremento de viscosidad del medio.

El elemento más utilizado es el agar, que forma un gel con el agua y tiene la facilidad de licuarse a los 100°C y solidificarse a 45°C o menos. Este elemento no es susceptible a digestión por las enzimas de las plantas y no reacciona con los constituyentes del medio de cultivo (Pierik, 1987).

### **Reguladores de crecimiento**

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

En la micropropagación de las plantas superiores, los reguladores de crecimiento, especialmente las auxinas y citocininas juegan un papel muy importante. Es decir que el cultivo de tejidos es casi imposible sin la utilización de reguladores de crecimiento. La adición de estos compuestos al medio de cultivo depende del tipo

de explante que se está utilizando y del método de propagación que se esté siguiendo.

En el caso de *A. tequilana*, Torres-Morán (2004<sup>a</sup>), encontró un crecimiento diferencial de brotes en la micropropagación utilizando una combinación de auxinas y citocininas en el establecimiento de éste cultivo en condiciones *in vitro*.

### 3. FACTORES QUE AFECTAN EL CRECIMIENTO Y MORFOGÉNESIS *in vitro*.

Los factores que deben ser considerados por su influencia en el crecimiento y morfogénesis de los tejidos vegetales *in vitro*, son: La constitución genética de la planta, las condiciones ambientales y los factores dependientes del explante. Esta producción es posible gracias a las propiedades totipotentes de las células vegetales.

La morfogénesis se define como el proceso de formación de órganos a partir de un tejido vegetal (George, 1993). Comprende la organogénesis y la embriogénesis somática que son los procesos por los cuales es posible que se forme una nueva planta a partir de un tejido, un grupo de células o una célula individual.

En la siguiente Figura puede observarse el esquema de micropropagación que se sigue dependiendo del explante que se tome como inicio.

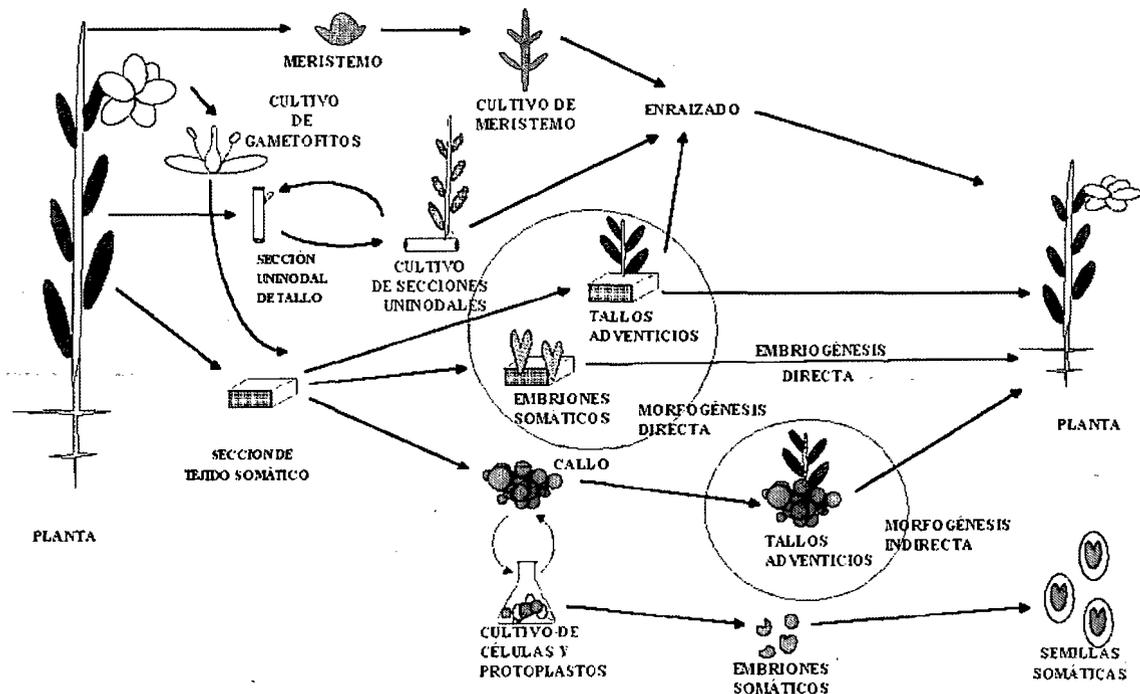


FIGURA 1. Diferentes tipos de explantes para iniciar cultivos *in vitro* (Lindsey y Jones, 1989).

La exposición de los tejidos a un ambiente como el que se les proporciona en condiciones de laboratorio durante la micropropagación, origina cambios en las nuevas plantas, es por ello que se debe poner atención en los métodos que se utilicen, ya que de ello depende la naturaleza de la morfogénesis mediante la cual se producen los nuevos individuos y de esto depende el resultado de ésta.

Afortunadamente, es posible manipular la morfogénesis gracias a la influencia de elementos como el Nitrógeno y los reguladores de crecimiento (Torres-Morán, 2005).

Según George (1993), la morfogénesis puede presentarse de dos maneras:

- Directa.- La que se origina a partir de células diferenciadas
- Indirecta.- La que se origina a partir de células desdiferenciadas y por lo tanto no especializadas llamadas "callo".

Por lo anterior, puede encontrarse métodos de micropropagación por organogénesis directa y por organogénesis indirecta, así como embriogénesis somática directa y embriogénesis somática indirecta.

En los métodos organogénicos, como es el caso del protocolo para *A. tequilana* que se describe en el presente trabajo, la formación de brotes es un evento que se produce en una etapa distinta de la de formación de raíces y para el mismo caso, los brotes y las raíces se producen de manera indirecta y también de manera directa.

La embriogénesis en cambio, produce una planta completa a partir de una célula individual y se producen en el mismo evento, la parte aérea y la raíz de la plántula (Santacruz, 2002).

Por otra parte, el crecimiento y desarrollo de una planta *in vitro* está determinado por una serie de factores complejos como son, su constitución genética, los nutrientes, el agua, los azúcares, factores físicos y algunas sustancias orgánicas entre las cuales, los principales son los reguladores de crecimiento (Pierik, 1987).

### ***Variación somaclonal***

Debido a que el cultivo de tejidos es un proceso no natural, la planta está constantemente expuesta a una combinación de estrés que no tiene

habitualmente en el cultivo normal. Sin embargo, señalan Cassells *et al.* (2003) que se observa una gran plasticidad del genoma vegetal para poder descifrar y responder a esa clase de estímulos. Según menciona este autor, la variación somaclonal es una respuesta de la planta al estrés que se produce durante la micropropagación y esta respuesta se traduce en cambios permanentes o aparentes en el fenotipo e incluso cambios en el genotipo de las plantas.

#### 4. MÉTODO DE MICROPROPAGACIÓN DE *Agave tequilana* WEBER VARIEDAD AZUL

##### *Selección en campo de fenotipos deseables*



FIGURA 2. Campo cultivado con *A. tequilana* Weber variedad azul, certificado por el Consejo Regulador del Tequila.

Selección de plantas madres de *A. tequilana* certificadas por el Consejo Regulador del Tequila (CRT) en un predio de dos años. Se seleccionan plantas vigorosas y sin ningún síntoma de enfermedades o plagas, en campos con buen estado de sanidad, como se muestra en la Figura 2.



FIGURA 3. Hijuelos de *A. tequilana*, con diferentes tamaños de tallo

Los hijuelos se seleccionan por el tamaño del tallo, que en el caso del presente protocolo, es el conocido como "tamaño limón", en la Figura 3 pueden observarse diferentes tamaños de hijuelo que se usan como explante o punto de partida para la micropropagación.

### ***Establecimiento in vitro***

El explante utilizado es el meristemo, obtenido del centro del tallo del hijuelo, al que se le eliminan las hojas para posteriormente desinfectarlo.

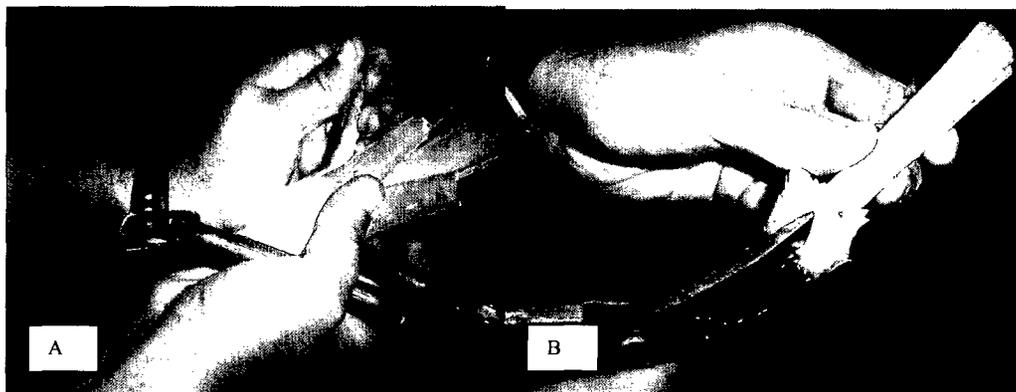


FIGURA 4. Preparación de un hijuelo de *A. tequilana* para establecimiento del cultivo *in vitro*. A. Eliminación de las hojas más grandes. B. Corte del tallo

### ***Tratamiento de desinfección***

Antes de empezar el proceso de esterilización, se debe retirar cualquier porción de suelo, hojas muertas y cualquier porción de tejido dañado.

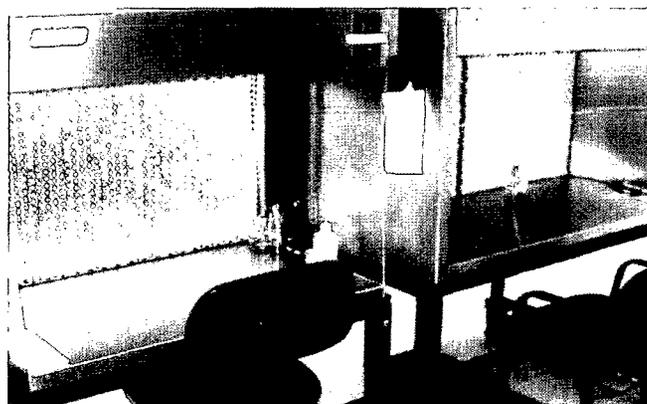


FIGURA 5. Campanas de flujo laminar

El tejido es esterilizado en su superficie por inmersión en una solución de alcohol y posteriormente en la campana de flujo laminar (Figura 5), se prepara la solución al

3% de hipoclorito de sodio obtenida de una solución comercial al 6% diluida en agua 1:1 v/v y se vuelven a sumergir los explantes en esta solución por 10 minutos antes de enjuagarlo dos veces con agua estéril destilada (Figura 6).



FIGURA 6. Desinfección de los explantes en una solución de cloro

Transcurridos los enjuagues, se cortan las superficies del explante y se elimina así este tejido, que ha sido dañado por el tratamiento de desinfección (Figura 7). Este paso también debe ser realizado en la campana de flujo laminar, sobre cajas de petrí previamente esterilizadas y usando bisturí y pinzas también esterilizados en mechero.

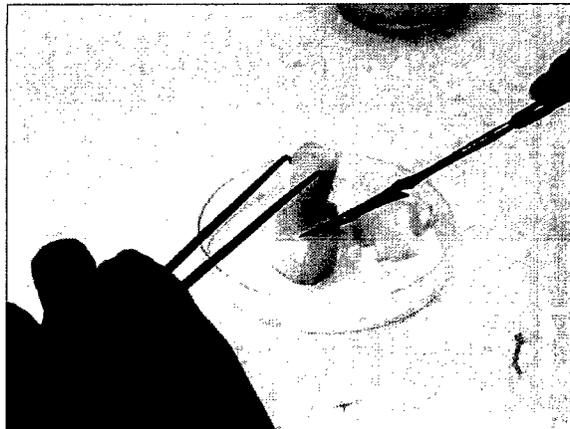


FIGURA 7. Corte del tejido dañado por el tratamiento de desinfección con cloro

Después del corte del tejido dañado, el material se siembra en medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) conocido como MS con reguladores de crecimiento Benciladenina y ácido 2,4-Diclorofenoxiacético también previamente esterilizado.

En la Figura 8, puede observarse el explante una vez establecido en el medio de cultivo mencionado, previamente esterilizado.



FIGURA 8. Establecimiento del cultivo *in vitro*, en medio de cultivo estéril

### Preparación del medio de cultivo

En forma práctica, el medio de cultivo para *A. tequilana*, se prepara en varios pasos que facilitan la utilización de la cantidad exacta que se requiere cuando se quieren preparar diferentes cantidades de medio, además de facilitar el almacenamiento de los elementos.

El siguiente esquema, ilustra los pasos en la preparación del medio.

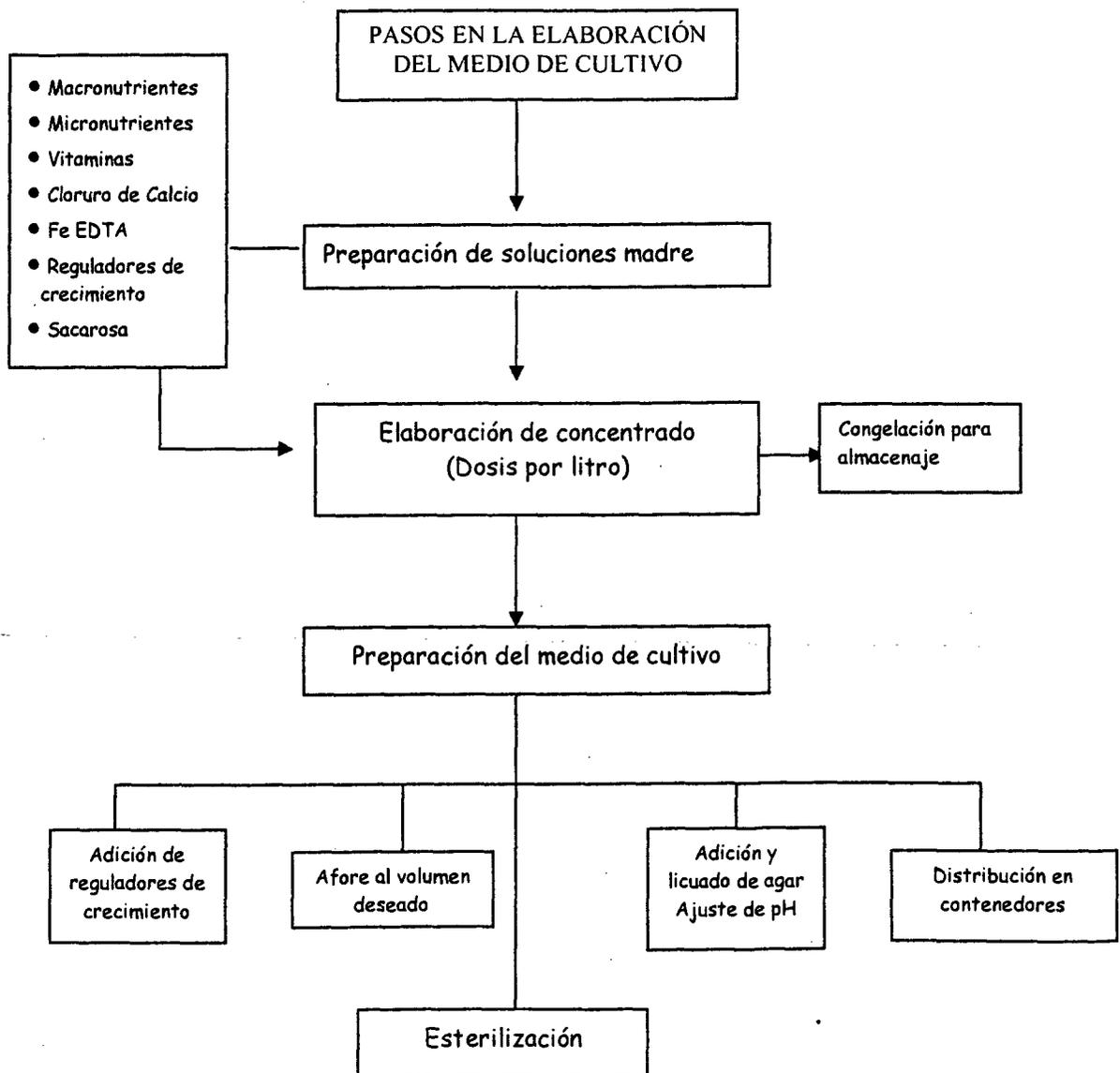


FIGURA 9. Esquema de la preparación de soluciones madre, concentrado y medio de cultivo

## 5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRE

### *Macronutrientes MS (Murashige y Skoog, 1962)*

Se pesan los macronutrientes, obtenidos de las sales mencionadas en el siguiente cuadro.

CUADRO 1. Elementos utilizados para preparar 1 litro de solución madre de macronutrientes MS.

Nombre	Fórmula	Cantidad (mg/l)
Nitrato de Amonio	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
Nitrato de Potasio	$\text{KNO}_3$	1900
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
Fosfato de Potasio Monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170

Los macronutrientes, por la cantidad que se utiliza, pueden ser pesados con balanza granataria como la que se muestra en la Figura 10 (precisión de 0.01 g), utilizando espátulas para ajustar el peso quitando o añadiendo la sal que se esté pesando.

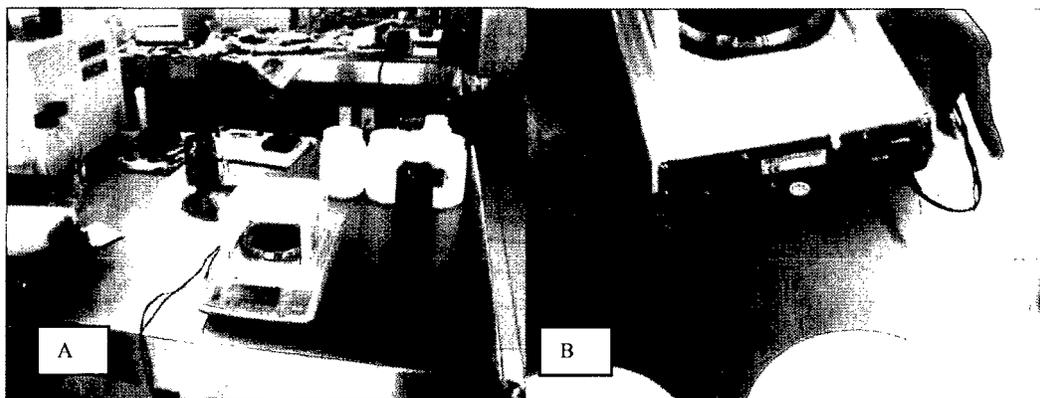


FIGURA 10 A. Balanza granataria B. Nivelación de la balanza con nivel de burbuja

Respetando el orden mencionado se añaden los elementos a un matraz, que contenga agua bidestilada, así como agitador magnético para facilitar la agitación en placa caliente. Se disuelven uno a uno las sales y se agrega el siguiente hasta que haya disuelto el anterior, el color de la solución debe ser transparente

La disolución se inicia con una cantidad pequeña de agua, tomando en cuenta que el volumen final no debe pasar de la cantidad que se va a preparar.

La cantidades de elementos que se mencionan en el cuadro 1, son las que se utilizan para preparar un litro, pero éstas pueden ser multiplicadas por 5 para preparar 5 litros, por 10 para preparar 10 litros y así sucesivamente. Esas cantidades deben ser concentradas en un volumen menor de agua para poder almacenarse en recipientes pequeños y poder ser utilizadas como solución madre en la preparación de concentrados.

Por ejemplo, en el siguiente cuadro, se marcan las cantidades necesarias para preparar 5 litros de medio, pero después de pesarlas, pueden ser disueltas en 50 ml de agua destilada, de esa forma, cada 10 ml contendrán la cantidad necesaria para preparar 1 litro de medio de cultivo, o bien utilizarse para la preparación de concentrado como se indica posteriormente.

CUADRO 2. Elementos utilizados para preparar solución madre de macronutrientes MS.

Nombre	Fórmula	Cantidad (mg/l)	Cantidad para 5 lt
Nitrato de Amonio	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	8.250 g
Nitrato de Potasio	$\text{KNO}_3$	1900	9.5 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	1.85 g
Fosfato de Potasio Monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	0.85 g

La solución ya preparada, puede almacenarse a temperatura ambiente, en un frasco de vidrio.

### ***Micronutrientes MS (Murashige y Skoog, 1962)***

Para preparar la solución madre de micronutrientes MS, se procede de igual forma que con los macronutrientes, tomando en cuenta las cantidades y los elementos que se mencionan en el Cuadro 3.

Por las cantidades que se utilizan, es necesario pesar estos microelementos en una balanza analítica como se muestra en la Figura 11 (precisión 0.1 mg).

La disolución de los elementos se hace en poca cantidad de agua bidestilada, según las cantidades que se van a preparar. En el Cuadro 3 se indican las cantidades necesarias por litro de medio de cultivo.

Para preparar la solución madre concentrada, se procede como se explicó para los macronutrientes.

CUADRO 3. Elementos utilizados para preparar solución madre de micronutrientes MS.

Nombre	Fórmula	Cantidad (g/l)
Ácido Bórico	$H_3BO_3$	6.20
Sulfato de Manganeso Monohidratado	$MnSO_4 \cdot H_2O$	16.90
Sulfato de Zinc Heptahidratado	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8.60
Yoduro de Potasio	KI	0.83
Molibdato de Sodio Dihidratado	$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	0.25
Sulfato de Cobre Pentahidratado	$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0.025
Cloruro de Cobalto Hexahidratado	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025

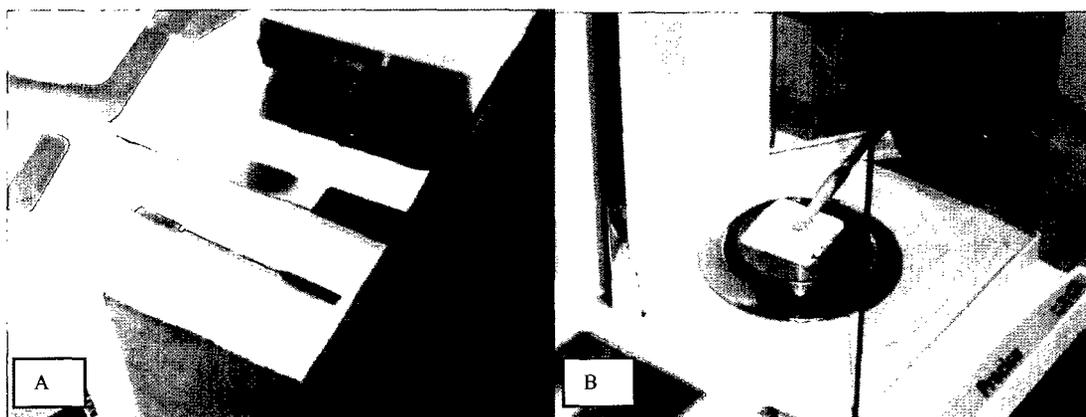


FIGURA 11. A. Espátulas para pesado de sales y componentes del medio. B. Pesado en balanza analítica

Como puede observarse, la preparación de la solución madre de micronutrientes, es similar a la anterior (macronutrientes), con la diferencia de cantidades de sales que deben disolverse. Sin embargo, en este procedimiento también es importante comenzar la disolución en poca cantidad de agua, teniendo cuidado de añadir un compuesto cuando el anterior se ha disuelto completamente.

El almacenamiento de esta solución puede hacerse a temperatura ambiente, en lugar fresco; si el ambiente de almacenaje es muy cálido, entonces debe refrigerarse la solución a 2° C.

### **Solución madre de Vitaminas**

En el Cuadro 4, se presentan las vitaminas que se utilizan para la preparación de medio de cultivo para *A. tequilana*, que son las reportadas por Phillips y Collins (1979).

Por las cantidades utilizadas, las vitaminas se pesan en balanza analítica, de manera similar que en la preparación de micronutrientes.

CUADRO 4. Elementos utilizados para preparar solución madre de vitaminas.

Nombre	Cantidad (mg/l)
Tiamina	200
Piridoxina	50
Myo- Inositol	25

La preparación de la solución madre de vitaminas, es similar a las mencionadas anteriormente, sin embargo, se debe tomar en cuenta que las vitaminas se degradan con el calor y almacenadas a temperatura ambiente también pueden contaminarse, por lo que deben almacenarse en congelador.

Para ello, una forma práctica es preparar las cantidades que menciona el cuadro anterior, multiplicadas por la cantidad de litros que se van a preparar y aforar en volumen menor. Posteriormente, distribuir la solución preparada, una vez que ha sido aforada al volumen adecuado, en contenedores con 100 ml cada uno, etiquetados para posteriormente congelarlos (Figura 12).

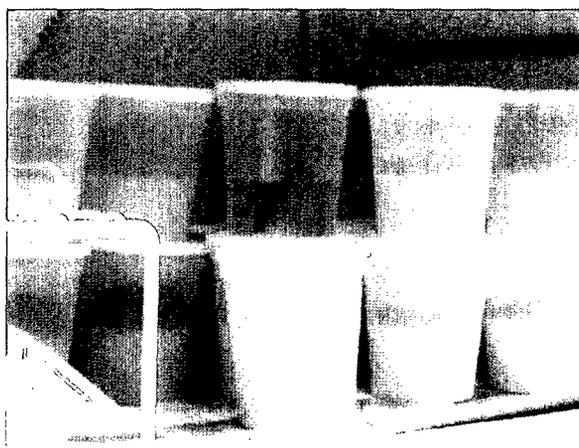


FIGURA 12. Solución madre de vitaminas congeladas para su almacenamiento

### ***Preparación de solución madre de Cloruro de Calcio***

El cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Cloruro de Calcio Dihidratado) es una sal que precipita con otras sales componentes del medio de cultivo, por lo que en la práctica es mejor prepararla en una solución separada de las otras.

La concentración necesaria es de 1Molar, por lo que se disuelven 20 gramos por litro ya que su peso molecular es de 20.

Se pesa en balanza granataria (precisión de 0.01 g). Una vez obtenida la solución de Cloruro de Calcio se coloca en un frasco con tapa y se almacena a temperatura ambiente.

### ***Preparación de solución madre de Fe EDTA***

Para preparar la solución madre de este compuesto, son necesarios dos elementos:

1.  $\text{Fe SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  ( Sulfato Ferroso Heptahidratado) 2.78 gramos por litro.
2.  $\text{Na}_2 \text{EDTA}$  ( Etilendinitrilotetracetato de Sodio) 3.73 gramos por litro.

Se pesan con balanza granataria, y se disuelven en aproximadamente 500 ml de agua destilada, añadiendo primero el EDTA y cuando éste está disuelto, se añade el Sulfato de Hierro.

Una vez obtenida la solución Stock de Fe EDTA, se tapa y se almacena en refrigeración a 4° C y en frasco color ámbar para evitar que se degrade con la luz.

### ***Preparación de soluciones madre de Reguladores de Crecimiento***

Las soluciones madre de reguladores de crecimiento se preparan en una concentración peso/volumen de 1mg/ 1ml, ya que esto facilita su adición en el medio de cultivo. Las soluciones de 6-bencilaminopurina (BA) y Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético (2,4-D) se preparan agregando NaOH 1N (hidróxido de sodio 1 normal) o etanol absoluto, gota a gota hasta que la solución este totalmente transparente. Posteriormente, se afora con agua bidestilada al volumen deseado en un matraz volumétrico o una probeta, como se muestra en la Figura 13, ayudándose de una piseta para evitar añadir un mayor volumen de agua. La solución debe almacenarse a 4° C en un recipiente de color ámbar.



FIGURA 13. Afore de las soluciones ajustando el volumen con piseta

### **Preparación de Concentrado de Medio Cultivo**

El concentrado se utiliza como una forma de facilitar el almacenaje y la preparación de medio de cultivo. Generalmente, las cantidades requeridas por litro, se concentran en un menor volumen de líquido y se almacena congelado en cantidades por litro, por ejemplo, para el caso del medio MS, las cantidades requeridas se diluyen en un volumen 10 veces menor, por lo que 100 ml de concentrado sirven para preparar 1 lt de medio.

Utilizando diluciones en múltiplos de 10, se facilita la preparación de las soluciones madre, como se explicó anteriormente y a su vez la preparación de los concentrados para preparar el medio de cultivo.

Para preparar el concentrado, se parte de las soluciones madre ya preparadas, mezclando las cantidades necesarias como se menciona en el siguiente cuadro.

Se debe tomar en cuenta cuanta cantidad de concentrados se puede almacenar y preparar las cantidades como se indica posteriormente.

CUADRO 5. Cantidades necesarias de soluciones madre para preparar concentrado de medio de cultivo MS.

Solución Stock	Cantidades para un litro (ml)	Cantidades para 20 litros concentradas en 2 litros (ml)	Cantidades para 50 litros concentradas en 5 litros (ml)
Macronutrientes	10	200	500
Micronutrientes	5	100	250
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	22	440	1100
Fe .EDTA	10	200	500
Vitaminas L2	10	200	500
Sacarosa	30 g	600 g	1.5kg



FIGURA 14. Soluciones madre para la preparación de concentrado de medio de cultivo

Las cantidades marcadas para cada solución, se mezclan en un vaso de precipitado previamente colocado en una placa de agitación con un agitador magnético (Figura 15) y se adiciona un pequeño volumen de agua para facilitar la disolución de la sacarosa, que es el último elemento que se añade, teniendo cuidado de no exceder el volumen que se va a preparar.



FIGURA 15. Placa de agitación y vaso de precipitado para preparar soluciones.

Respetando el orden mencionado se toman las cantidades de cada solución con una pipeta limpia y seca, se utiliza una pipeta para cada solución para no mezclar elementos de una solución con las demás (Figura 16).



FIGURA 16. Adición de las soluciones madre para preparación de concentrado.

El concentrado se afora a la cantidad requerida y se distribuye en los contenedores donde se almacenará. De manera práctica, el concentrado se distribuye en 100 ml por cada contenedor, tomando en cuenta que cada 100 ml de éste concentrado se utiliza para preparar un litro de medio de cultivo.

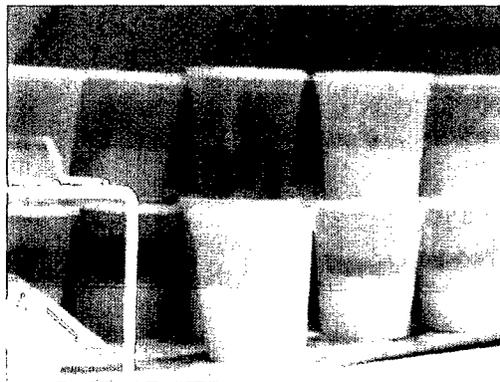


FIGURA 17. Concentrado de medio MS en congelación para su almacenamiento.

### ***Preparación del medio de cultivo***

El medio de cultivo preparado a partir de un concentrado (Figura 17) es mucho más fácil de preparar, los pasos son los siguientes:

1. Descongelado del concentrado. Puede hacerse en el horno de microondas, cuidando que no se caliente demasiado.

2. Adición de los reguladores de crecimiento en las siguientes cantidades: 25µl de solución madre de 2,4-D y 10 ml de solución madre de BA (Figura 18).
3. Afore del medio (Figura 19).
4. Ajuste del pH a  $5.8 \pm 0.02$  (Figura 20).
5. Colocar 500 ml del medio en matraces con capacidad de 1 litro.
6. Pesado de agar 4 g por cada medio litro (Figura 21).
7. Disolver el agar calentando en el horno de microondas, teniendo cuidado de que éste no hierva (Figura 22).
8. Distribución en contenedores, aproximadamente 29 ml en cada uno. Cada 500 ml se distribuyen en 17 contenedores (Figura 23).
9. Esterilización del medio en autoclave 15 min. a 121°C y 18 lb/pg (Figura 24).



FIGURA 18. Adición de los reguladores de crecimiento con micropipeta.



FIGURA 19. Afore de la solución del medio de cultivo.

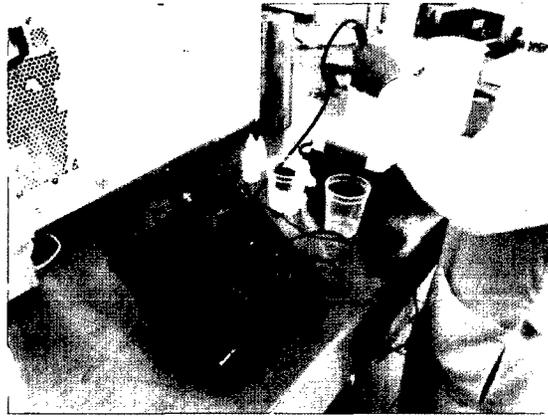


FIGURA 20. Medición y ajuste del pH.

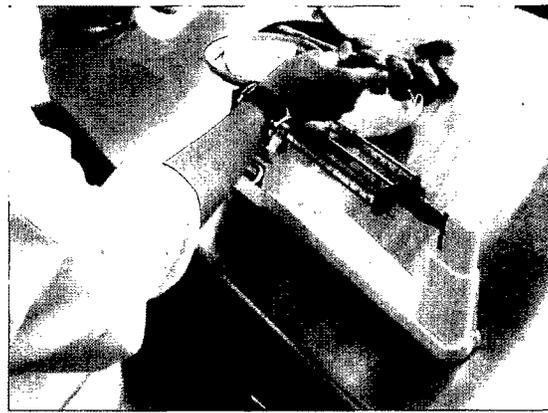


FIGURA 21. Pesado del agar.

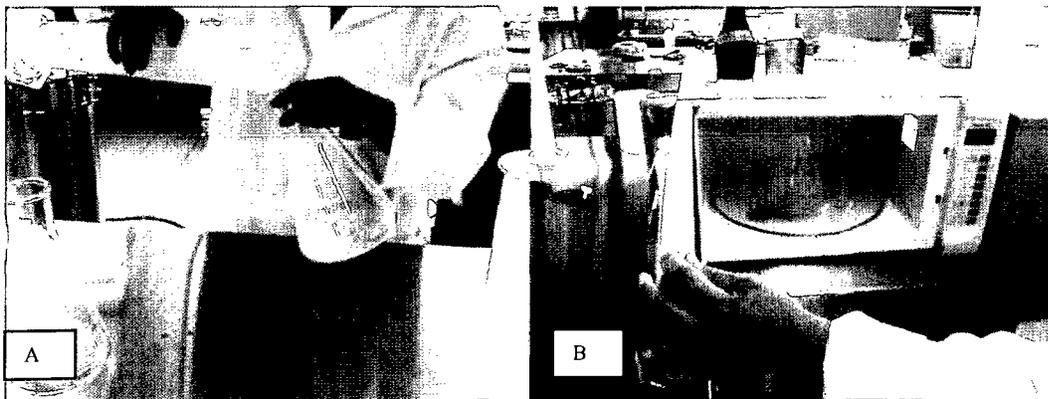


FIGURA 22. A. Adición del agar al medio B. Licuado del agar.



FIGURA 23. Distribución del medio en contenedores.

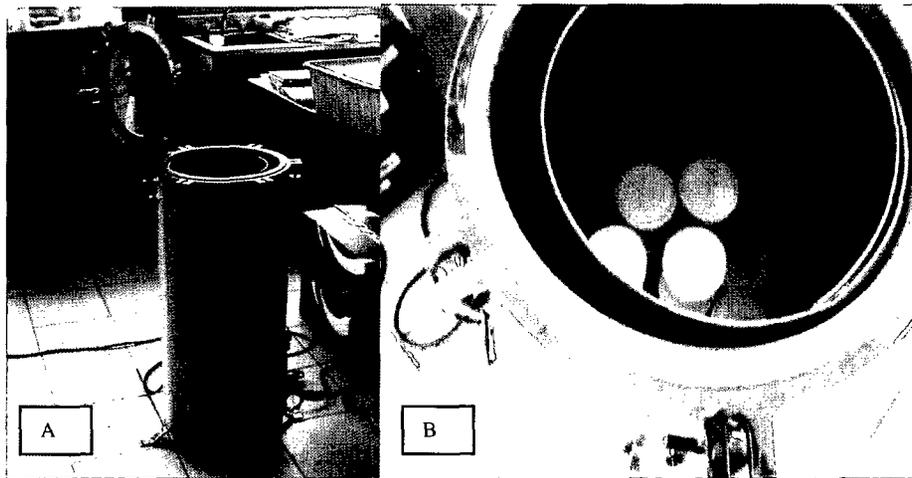


FIGURA 24. A. Autoclave B. Acomodo de los contenedores dentro de la autoclave para su esterilización

## 6. FASE DE PROPAGACIÓN CONSTANTE.

Una vez que se han establecido los cultivos *in vitro* se llega a una fase que se llama de propagación constante, en donde se produce una cantidad indefinida de brotes en cada explante y donde es necesario realizar resiembras, es decir, transferir los nuevos brotes y el explante a un medio de cultivo recién preparado en donde el nuevo brote pueda tener de nuevo una cantidad suficiente de elementos minerales de donde pueda abastecerse para su crecimiento y a la vez producir nuevamente brotes.

Los sub-cultivos o transferencia de los brotes producidos a un nuevo medio, es una práctica que debe realizarse en la campana de flujo laminar, en un ambiente aséptico para evitar contaminación.

La propagación constante se hará hasta obtener el número de plántulas deseado. Pueden cosecharse brotes adecuados para el enraizamiento, cada 3 semanas. Al realizar las resiembras, se separan los brotes chicos para sembrarse en el medio de propagación.

Las condiciones de incubación son: temperatura entre 27-30°C y periodo de iluminación de 16 h y 8 de oscuridad.

Las reglas que deben seguirse para una propagación sin contaminación o con el mínimo de ésta, son las siguientes:

1. Uso de bata y cubrebocas
2. Lavarse las manos con jabón antibacterial antes de comenzar a trabajar en la campana de flujo laminar.
3. Utilizar lentes protectores
4. Desinfectar la superficie de la campana utilizando alcohol.
5. Desinfectar con alcohol la superficie de los contenedores que vayan a introducirse en la campana de flujo laminar, tanto los del medio estéril, como los que contienen al cultivo.
6. Utilizar cajas de petri esterilizadas previamente para realizar los cortes de tejido muerto y división de los grupos de brotes del cultivo que se van a transferir.

7. Contar con mechero de gas o de alcohol dentro de la campana, para esterilizar las pinzas y bisturí que se usan para el proceso.
8. Tener a la mano papel absorbente para limpiar la campana y los contenedores.
9. Utilizar una piseta con alcohol para desinfectar.
10. Al final del proceso, rotular los frascos con marcador permanente y sellar con Kleen-pack.

Deben revisarse los contenedores con las plantas que vayan a sembrarse, ya que con el tiempo que permanecen en el incubador, pueden contaminarse con microorganismos del medio ambiente, puesto que los contenedores no permanecen sellados herméticamente, es decir, tanto la tapa como la película plástica (kleen pack) permiten en una cantidad mínima el intercambio gaseoso con el exterior, lo cual en ocasiones puede dar paso a contaminantes.

Una vez en la campana de flujo laminar, puede comenzarse la transferencia de los brotes como se puede observar en las Figuras 25 y 26.



FIGURA 25. Extracción de brotes en Campana de flujo laminar.



FIGURA 26. Separación de brotes en Campana de flujo laminar con bisturí y pinzas sobre caja de petri

En la transferencia, deben eliminarse tanto los tejidos que estén dañados por oxidación, los cuales presentan un color muy oscuro, como los callos que se producen en la base de los brotes.

En la Figura 27 puede observarse un brote producido por proliferación de yemas, el cual presenta una planta bien formada a la que solamente le falta la raíz.

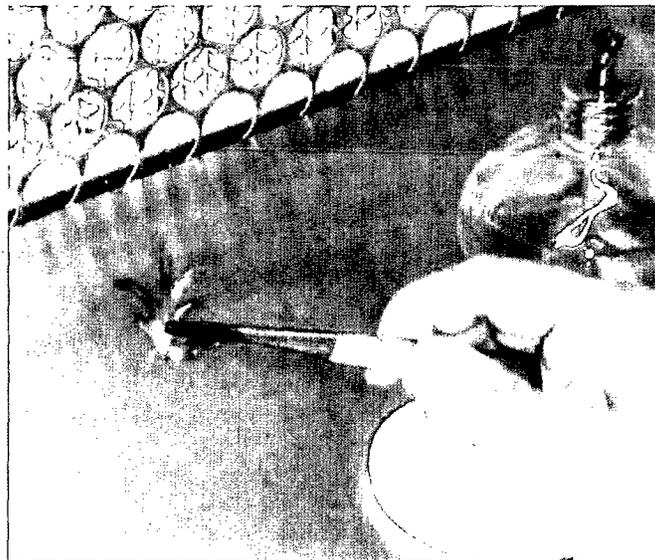


FIGURA 27. Producción de brotes por yemas axilares

Una vez eliminado el tejido dañado, las hojas secas y la producción excesiva de callo, los brotes limpios se transfieren al medio de cultivo fresco (preparado recientemente). A esta acción se le denomina “resiembrado” (Figura 28).

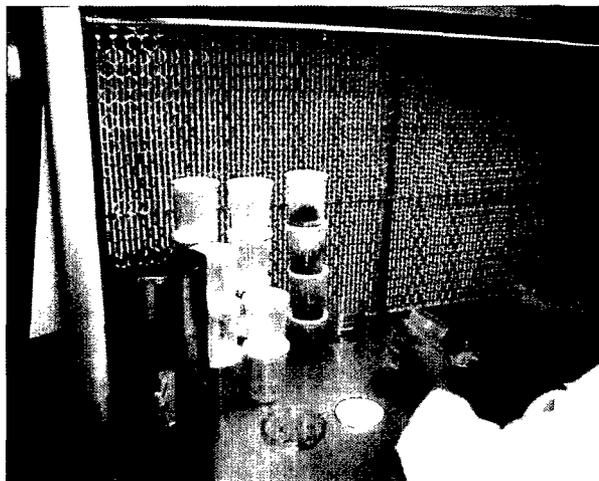


FIGURA 28. Resiembrado de brotes en Campana de flujo laminar en condiciones asépticas

Para facilitar la identificación, después de sellar los botes con película plástica (Figura 29), se marca en la tapa el genotipo de la planta que se está resembrando y la fecha de resiembrado.



FIGURA 29. Sellado de contenedores con película plástica (Kleen pack) en Campana de flujo laminar

El contenedor con los brotes recién resembrados, es llevado al incubador en donde se le da nuevamente las condiciones de incubación (luz y temperatura) que se mencionaron anteriormente.



FIGURA 30. Incubador con luz, temperatura y humedad controladas

### **Esquema de la selección de brotes para enraizamiento y adaptación a invernadero**

Durante la fase de propagación constante, se producen innumerables brotes que se van multiplicando a través de las resiembras del material.

Cuando la micropropagación obedece a un programa comercial, se pretende obtener plantas que se transfieran a invernadero periódicamente para asegurar el abasto y a su vez, incorporar nuevamente a la propagación constante aquellas plantas que todavía no logren el tamaño o la calidad deseada para su adaptación en invernadero.

En la siguiente Figura, se muestra un esquema de este proceso.

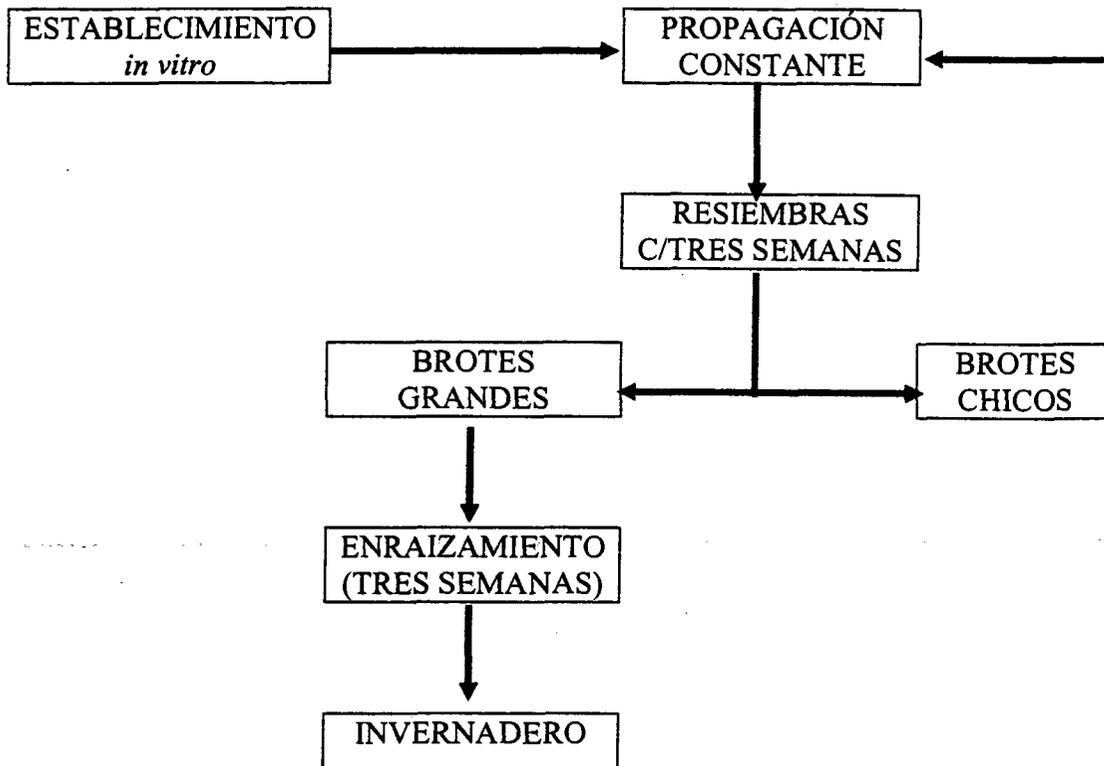


FIGURA 31. Esquema de la selección de brotes en un programa de micropropagación.

## 7. PREPARACIÓN A LA ACLIMATACIÓN

Existen algunos aspectos que deben tomarse en cuenta antes de comenzar la transferencia de los cultivos micropropagados a condiciones de invernadero. El primero de ellos es, que las plantas originadas *in vitro* bajo condiciones de muy alta humedad relativa y luz constante, carecen de cera epicuticular, presentando un reducido número de estomas y en ocasiones no sobreviven fuera del medio de cultivo (Cassells, 2003).

La anterior condición, exige que se tengan un periodo de pre-adaptación de los brotes para el trasplante a invernadero. La preadaptación se promueve cuando durante la resiembra se seleccionan y se individualizan los brotes más grandes (Figura 32) y después son colocados en medio de cultivo, como se muestra en la Figura 33, con mayor cantidad de azúcar, este puede ser el mismo medio base MS al que se le adicionan 15 gramos más de azúcar por litro y se suprimen los reguladores de crecimiento (Torres- Morán ,2004<sup>b</sup>).

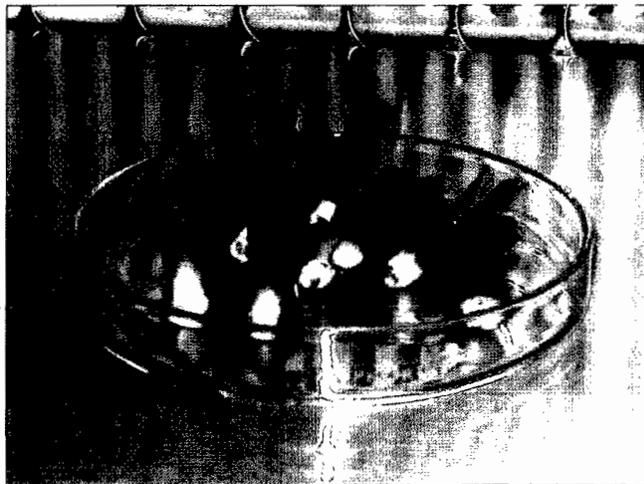


FIGURA 32. Brotes individualizados para su enraizamiento

Bajo estas condiciones las plantas se tornan de un color verde oscuro y más opaco debido al incremento de la cera epicuticular, es en este momento, cuando se originan raíces y se predisponen las plántulas para la transferencia al suelo.

Las plántulas enraizadas *in vitro* crecen rápido y presentan un índice de supervivencia de hasta 95 %. En la Figura 34 puede observarse la cantidad de raíces que se producen cuando la planta está en las condiciones mencionadas.

Sánchez (1991) probó dos medios para enraizamiento, los dos utilizando como medio basal el medio MS, sin incrementar la cantidad de azúcar y utilizando en uno de ellos el ácido indolacético como enraizador. Los resultados que obtuvo, fueron mayor enraizamiento en el medio que no contenía regulador de crecimiento y un tiempo de enraizamiento de tres semanas. Lo anterior concuerda con lo reportado por Torres-Morán (2004<sup>b</sup>) y por Robert *et al.*,(1987).



FIGURA 33. Brotes individualizados y sembrados en el medio de enraizamiento



FIGURA 34. Enraizamiento de brotes en medio de cultivo

## 8. TRANSFERENCIA A INVERNADERO

Las plantas enraizadas son enjuagadas con agua corriente para eliminar el agar (Figura 35) y son colocadas en charolas germinadoras con cavidades de 4.5 x 4.5 cm conteniendo mezcla 6:4 de turba Canadiense (peat moss) y agrolita (Figura 36). Las plantas son colocadas en invernadero con malla sombra (Figura 37), e irrigadas por aspersion para asegurar humedad relativa constante de alrededor de 80%, después de 10-12 semanas son transferidas al vivero (Torres-Morán, 2004<sup>b</sup>).

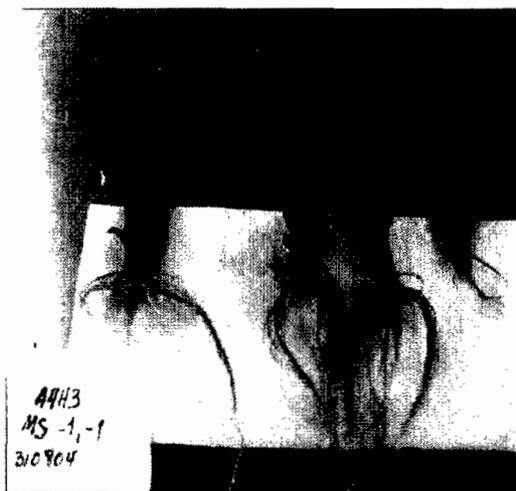


FIGURA 35 Lavado de raíces para su transferencia a sustrato en invernadero



FIGURA 36. Charolas con plantas de *A. tequilana* en su fase de adaptación en invernadero.



FIGURA 37. Plantas en condiciones controladas de humedad relativa en invernadero.

## 9. FASE DE VIVERO.

La fase de vivero, permite a la planta acumular reservas en el tallo, mismas que necesitará para su plantación definitiva en campo antes de la época de lluvias.

Gracias al manejo de riegos y fertilización en esta etapa, las plantas alcanzan un tamaño "toronja" (alrededor de 14 cm de diámetro de tallo) en aproximadamente 7 meses.

En la actualidad, pueden encontrarse viveros de *A. tequilana* tecnificados, en donde se utiliza el acolchado y el riego por goteo como ese muestra en la Figura 38.

Utilizando ésta tecnología, se consigue un crecimiento uniforme de las plantas y esto facilita la programación de los cultivos.



FIGURA 38. Plantas de *A. tequilana* en un vivero tecnificado (riego por goteo y acolchado)

En la Figura 39, puede observarse que en el vivero, puede manejarse un control integral de las malezas, lo cual garantiza en buena medida la sanidad del cultivo y su crecimiento uniforme, aunado lo anterior a un buen programa de fertilización del cultivo.



FIGURA 39. Vivero de plantas de *A. tequilana* producidas por cultivo de tejidos.

Una vez completado el tiempo que la planta debe permanecer en el vivero, esto es, después que alcanza un tamaño de tallo adecuado para su transplante definitivo a campo, el cultivo se inicia con materiales que se encuentran libres de enfermedades, como puede observarse en la Figura 40.



FIGURA 40. Plantas de *A. tequilana* establecidas en campo

## 10. CONCEPTOS UTILIZADOS EN LA MICROPROPAGACIÓN

Adventicio	Tejido u órgano que se produce fuera del lugar donde debería producirse.
Agar	Producto de origen vegetal obtenido a partir de algas, que se utiliza para solidificar medios de cultivo.
Aséptico	Ausencia completa de microorganismos.
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 brotes.
Callo	Tejido des-diferenciado o células vegetales no organizadas que pueden encontrarse en masas de tejido agregado, o bien puede estar disperso en un medio líquido en agitación
Citocinina	Grupo de hormonas vegetales naturales o sintéticas, que inducen a la división celular y frecuentemente la formación de yemas adventicias (en los brotes). En la mayoría de los casos inhiben la formación de raíces adventicias, disminuyendo la dominancia apical.
Clon	Grupo de organismos genéticamente idénticos debido a que han sido producidos por algún tipo de reproducción asexual.
Cultivo de tejidos vegetales	Es la ciencia o proceso de crecer células, tejidos u órganos vegetales aislados de una planta madre, en medios artificiales.
Embriogénesis somática	Proceso morfogénico mediante el cual se forma un embrión a partir de una célula somática
Explante	El cultivo de tejidos tiene como punto de partida,

	pequeñas piezas de plantas. Los pequeños órganos o piezas de tejido que son usadas. Material vegetal utilizado para iniciar la micropropagación
Hormona vegetal	Sustancia producida naturalmente en forma endógena por la planta, que regula el crecimiento de la misma.
Medio de cultivo	Compuesto que se utiliza en la micropropagación para proporcionar al cultivo los elementos indispensables para su desarrollo. Puede ser líquido o semisólido.
Meristemo	Conjunto de células en división en el ápice de la raíz o brote (Meristemo apical), en el cambium intercalar de las yemas, hojas y flores.
Micropropagación	Producción masiva de plantas <i>in vitro</i> .
Morfogénesis	Es el proceso de formación de órganos a partir de un tejido vegetal. Comprende la organogénesis y la embriogénesis somática.
Organogénesis	Proceso morfogénico mediante el cual se forman órganos a partir de una o un grupo de células
Regulador de crecimiento	Son compuestos que, en muy pequeñas concentraciones son capaces de modificar el crecimiento y/o la morfogénesis en plantas
Tejido competente	Tejido que posee cierto grado de diferenciación, sin el cual el fenómeno de inducción no se llevaría a cabo.
Totipotencia	Es la propiedad de una célula o tejido vegetal, de poder crear por sí mismo, un organismo completo y autosuficiente.
Variación somaclonal	Incremento de la variabilidad genética en las plantas, que tiene lugar en el cultivo <i>in vitro</i>
Vitrificación	Enfermedad fisiológica que aparece en las plantas que disponen de una gran cantidad de agua, o con baja concentración de agar.

## 11. RIESGOS Y FALLAS EN EL PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN

Existen fallas y riesgos durante el proceso de micropropagación, que consisten en errores de manejo o bien, errores debidos a la naturaleza de los tejidos y a las condiciones de incubación. A continuación se ilustran algunas.

En la Figura 41, puede observarse un cultivo altamente contaminado por hongos. El micelio de los hongos prácticamente cubre el medio de cultivo dañando también los tejidos de la planta que se encuentra en el contenedor.

La contaminación por hongos puede resultar de la mala esterilización de los instrumentos que se utilizan para cortar los explantes, lo cual puede representar la presencia de esporas que germinan en el medio una vez inoculadas al momento de las resiembras.

Para evitar esta falla, lo más recomendable es esterilizar con el mechero la punta de las pinzas con las que se sujetan los explantes y la navaja del bisturí con que se cortan.



FIGURA 41. Cultivo contaminado por hongos

Otra de las fallas que pueden encontrarse durante la micropropagación, es la producción de fenoles que tiene lugar durante el desarrollo de los procesos

fisiológicos del explante que se encuentra *in vitro*, esto produce un tejido que presenta oscurecimiento o aparente pudrición.

Esto puede deberse a que no se eliminen los tejidos viejos durante la transferencia de los cultivos a medio nuevo.

El aspecto oxidado de las plantas puede observarse en la siguiente Figura.

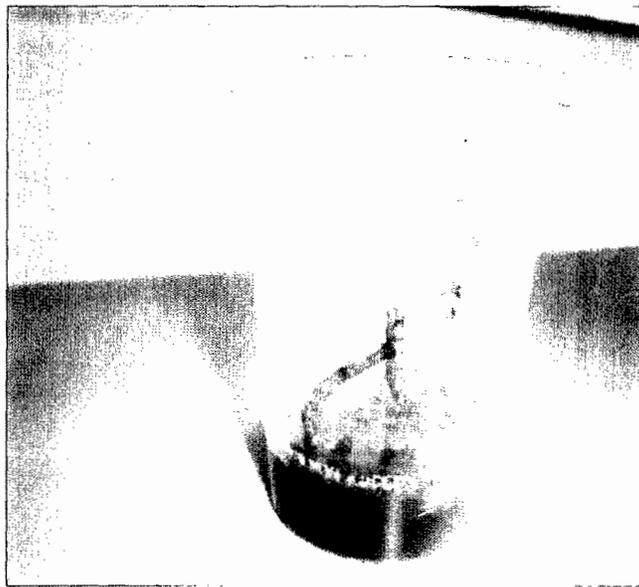


FIGURA 42. Oxidación del brote *in vitro*

En un programa de micropropagación masiva, deben cuidarse perfectamente los tiempos de transferencia de los cultivos a medio fresco recién preparado, ya que cuando los nutrientes se agotan, puede comenzar a producirse senescencia de los brotes producidos y pérdida de las plántulas, como lo muestra la Figura 43.

En esa misma Figura, puede observarse que, una vez agotados los reguladores de crecimiento, también comienzan a producirse raíces en las plantas.

Estos cultivos pueden ser resembrados a medio fresco para recuperar su capacidad de producción de brotes, pero esto significa un retraso en la producción de plántulas, con la consiguiente inconveniencia en un programa de producción masiva.



FIGURA 43. Producción excesiva y senescencia de brotes

Durante la limpieza de los brotes a la hora de la resiembra o transferencia a medio fresco, deben también eliminarse los tejidos que tienen apariencia de vidrio, esto es, los tejidos que han absorbido demasiada humedad del medio y que toman un aspecto "vitrificado". Este fenómeno es conocido como hiperhidricidad y puede evitarse utilizando las cantidades correctas de agar en la preparación del medio y revisando el pesado de los elementos minerales que contienen nitrógeno, ya que el exceso de este elemento también produce "vitrificación".



FIGURA 44. Vitrificación de los brotes *in vitro*.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Butenko. P. 1968. Plant Tissue Culture and Plant Morphogenesis. Israel Program for Scientific Translations. Jerusalén: 1:129.
2. Cassells, A.C., S.M.Joyce, E.A. O'Herlihy, M.J. Pérez-Sanz & C.Walsh. 2003. Stress and Quality in *In Vitro* Culture. Acta Hort. 625:153-164, ISHS.
3. George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. In practice. 2° Ed. Exegetics Ltd England. Vol. I y II.
4. Lindsey, L. y F. Jones. 1989. Plant biotechnology in agriculture. Open University Press. Wiley Ch. p. 59.
5. Mes, M., E.G.Groenewald, D.C.J.Wessels, y A.Koeleman. 1977. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (Agavaceae). Z. Pflanzenphysiol. 81:369-373.
6. Murashige,T. y L.Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology. 15:473-497.
7. Robert, M.L., J.L. Herrera, F. Contreras y K.N. Scorer. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). Plant Cell Tissue and Organ Culture. 8: 37-48
8. Phillips,G.C.y G.B.Collins. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop.Sci. 19:59-64.
9. Pierik, R.L.M. 1987. *In vitro* Culture of Higher Plants. 3a ed. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. The Netherlands. pp. 187.
10. Sánchez A., F.1991. Comparación de Metodologías de Micropropagación de *Agave tequilana* Weber. Tesis de licenciatura. UdG. pp. 97.
11. Santacruz R., F. 2002. Apuntes de la clase Cultivo de Tejidos Vegetales. CUCBA. UdG. Curso 2002B. (inéditos).
12. Torres-Morán, M. I., M. A. García Vázquez, F. Santacruz-Ruvalcaba, R. Nuño-Romero y J.P. Torres-Morán. 2004<sup>a</sup>. Eficiencia de establecimiento *in*

*vitro* de *Agave tequilana* Weber variedad azul. Memorias del IV Congreso Mexicano y III Latinoamericano y del Caribe de Cactáceas y otras suculentas. p 320.

13. Torres-Morán, M.I., F. Santacruz-Ruvalcaba, L. De la Cruz-Larios, M.A. García-Vázquez, M. García-Contreras, R. Nuño-Romero y J.P. Torres-Morán. 2004<sup>b</sup>. Adaptación de plantas de *Agave tequilana* Weber variedad azul propagadas por cultivo *in vitro*. Bol. Nakari 15(3): edición digital.
14. Torres-Morán, M.I. 2005. Evaluación de diferentes fuentes y niveles de nitrógeno y calcio en plantas de *Agave tequilana* Weber variedad azul, *in vitro* y en invernadero. Tesis Maestría en Ciencias Agrícolas y Forestales. UdG. pp. 66.