



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO DE LOS MATERIALES PARENTALES  
EMPLEADOS EN EL SISTEMA DE  
MICROPROPAGACIÓN DE *Agave fourcroydes* Lem.**

Tesis que presenta

Rosa María del Carmen Gómez Pérez

En opción al título de

**MAESTRA EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Septiembre, 2014





CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “Estudio de los materiales parentales empleados en el sistema de micropropagación de *Agave fourcroydes* Lem.” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Manuel L. Robert Díaz, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

---

Dr. Felipe Vázquez Flota  
Director de Docencia  
Mérida, Yucatán, México, Septiembre de 2014



## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento, proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que en razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:  \_\_\_\_\_

Nombre: Rosa María del Carmen Gómez Pérez



Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Estudio de los materiales parentales empleados en el sistema de micropropagación de *Agave fourcroydes* Lem." bajo la dirección del Dr. Manuel L. Robert Díaz, con el apoyo de la beca CONACYT No.427530.



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dr. Manuel Robert por su guía y apoyo para el desarrollo de este proyecto.

A los Doctores Víctor M. Loyola Vargas, Felipe Sánchez Teyer y Martín Esqueda Valle, por formar parte de mi comité tutorial y aportar sus comentarios y conocimientos.

A los técnicos M. en C. Miguel Herrera e Ing. Gastón Herrera, por su apoyo integral para el desarrollo experimental del proyecto.

A la Dra. Kelly Maribel Monja, por su conocimiento y amistad brindada.

Al Ing. Fernando Contreras, Javier González, Erik González y Raúl Chan Balam, por su apoyo en las colectas trimestrales y su ayuda en el trabajo de invernaderos y viveros.

A la Ing. Merly Canul, por su apoyo en el análisis estadístico.

Al Dr. Javier Hujara, por su apoyo en la técnica histológica.

A la técnica Rosa Ma. Galaz, al Dr. Benjamín Ayil Gutierrez y a Francisco. Javier Villalobos, por su apoyo técnico en la cuantificación por HPLC.



## **DEDICATORIAS**

*A mi familia:*

*Rosa María Pérez Arroyo*

*Germán Lorenzo Gómez Palacios*

*Patricia Gómez Pérez*

*Verónica Gpe. Maldonado Pérez*

*Mario Mireles, Jesús Germán Mireles Maldonado y Leonardo Fabrizio Mireles Maldonado*



**ÍNDICE**

ÍNDICE .....	I
LISTADO DE FIGURAS.....	v
LISTADO DE TABLAS.....	vii
LISTADO DE ANEXOS.....	ix
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT .....	xv
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES GENERALES .....	2
2.1 USO E IMPORTANCIA DEL HENEQUÉN. ....	2
2.2 BIOLOGÍA DE <i>Agave fourcroydes</i> .....	3
2.3 PROBLEMÁTICA ACTUAL DEL CULTIVO DE HENEQUÉN .....	5
2.4 EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (CTV).....	8
2.5 LA MICROPROPAGACIÓN .....	9
2.5 CULTIVO <i>in vitro</i> EN <i>Agave fourcroydes</i> .....	11
2.6 IMPORTANCIA DEL GENOTIPO EN EL CTV.....	Error! Marcador no definido.
4. PREGUNTAS DE INVETIGACIÓN E HIPÓTESIS .....	16
5. OBJETIVOS .....	17
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
7. BIBLIOGRAFÍA.....	20

CAPÍTULO II.....	27
EFECTO DE LA TALLA Y LAS CONDICIONES AMBIENTALES DE COLECTA EN LA PRODUCCIÓN DE BROTES <i>IN VITRO</i> EN <i>AGAVE FOURCROYDES</i> LEM. ....	27
1. INTRODUCCIÓN. ....	27
2. MATERIALES Y MÉTODOS. ....	28
2.1 CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL VEGETAL ....	28
2.2. CLASIFICACIÓN POR TALLA DE LOS HIJUELOS ....	28
2.3 COLECTA TRIMESTRAL DE HIJUELOS.....	29
2.4 OBTENCIÓN DEL COGOLLO. ....	29
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO ....	32
2.6 ANÁLISIS HISTOLÓGICO ....	33
3. RESULTADOS. ....	33
4. DISCUSIÓN. ....	41
5. CONCLUSIÓN ....	44
CAPÍTULO III.....	47
EMPLEO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS COMO MATERIAL PARENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE BROTES ADVENTICIOS EN <i>AGAVE FOURCROYDES</i> LEM. ....	47
1. INTRODUCCIÓN ....	47
2. MATERIALES Y MÉTODOS ....	48
2.3 OBTENCIÓN DE LA ZONA MERISTEMÁTICA E INDUCCIÓN DE BROTES. ....	49
3. RESULTADOS ....	51
4. DISCUSIÓN.....	57
5. CONCLUSIÓN ....	60

CAPÍTULO IV .....	63
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS .....	63
1. CONCLUSIONES.....	63
2. PERSPECTIVAS.....	64



**LISTADO DE FIGURAS**

<b>Figura 1.1</b> <i>Agave fourcroydes</i> de la Hacienda San Eduardo en Dzemul, Yucatán	7
<b>Figura 1.2</b> Estrategia experimental	19
<b>Figura 2.1</b> Lugar de colecta de los hijuelos	28
<b>Figura 2.2</b> Aspecto de los hijuelos por cada rango de altura	29
<b>Figura 2.3</b> Cogollo de plantas colectadas	30
<b>Figura 2.4</b> Lavado de cogollo	31
<b>Figura 2.5</b> Caracterización morfológica de los hijuelos de <i>Agave fourcroydes</i>	35
<b>Figura 2.6.</b> Porcentajes de contaminación de explantes durante las primeras 8 semanas de cultivo	34
<b>Figura 2.7</b> Corte transversal de la zona meristemática de plantas convencionales	38
<b>Figura 3.1</b> Lugar de aclimatación de plantas propagadas <i>in vitro</i>	49
<b>Figura 3.2</b> Promedio y desviación estándar de las tallas observadas en plantas aclimatadas	51
<b>Figura 3.3</b> Promedio del ancho de la base, diámetro y longitud del cogollo de plantas aclimatadas	52
<b>Figura 3.4</b> Promedio hojas de plantas aclimatadas	52
<b>Figura 3.5</b> Plantas de origen micropropagado provenientes de la clona K33 con 16 meses de aclimatación	54
<b>Figura 3.6</b> Cortes transversales de la zona meristemática de la clona K33 utilizada como material parental	56

**LISTADO DE TABLAS**

<b>Tabla 1.1</b> Trabajos de regeneración in vitro realizados en <i>Agave fourcroydes</i> y otras especies productoras de fibra	12
<b>Tabla 2.1</b> Tiempo adecuado de inmersión en NaCl al 40% v/v por características del cogollo	29
<b>Tabla 2.2</b> Producción de brotes en relación con la talla de la planta	35
<b>Tabla 2.3</b> Promedio de producción de brotes por explante de todas la tallas, en relación con el mes de colecta, relación con el promedio de brotes por explante	37
<b>Tabla 2.4.</b> Producción de brotes de acuerdo con la altura de los hijuelos colectados en diferentes meses del año	38
<b>Tabla 3.1.</b> Producción de brotes por explante de acuerdo al lugar de aclimatación y vía de propagación	53
<b>Tabla 3.2</b> Producción de brotes de acuerdo con el lugar de aclimatación, origen de propagación <i>in vitro</i> y talla promedio de las plantas	55
<b>Tabla 3.3</b> Producción de brotes de la zona meristemática de acuerdo al origen del material parental	58

ACTIVIDAD EN OBTENIR

ESTRATEGIAS DE ENSEÑANZA Y APRENDIZAJE EN EL PROCESO DE ENSEÑANZA

ESTRATEGIAS DE ENSEÑANZA Y APRENDIZAJE EN EL PROCESO DE ENSEÑANZA

**LISTADO DE ANEXOS**

<b>ANEXO 1:</b> MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE Y SKOOG-B (MODIFICADO POR Robert <i>et al</i> , 1987)	65
<b>ANEXO 2:</b> METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS HISTOLÓGICO	66

Introduction	1
Chapter 1: The History of the United States	10
Chapter 2: The American Revolution	25
Chapter 3: The Early Republic	40
Chapter 4: The Industrial Revolution	55
Chapter 5: The Civil War	70
Chapter 6: Reconstruction	85
Chapter 7: The Gilded Age	100
Chapter 8: The Progressive Era	115
Chapter 9: World War I	130
Chapter 10: The Roaring Twenties	145
Chapter 11: The Great Depression	160
Chapter 12: World War II	175
Chapter 13: The Cold War	190
Chapter 14: The Vietnam War	205
Chapter 15: The 1960s	220
Chapter 16: The 1970s	235
Chapter 17: The 1980s	250
Chapter 18: The 1990s	265
Chapter 19: The 2000s	280
Chapter 20: The 2010s	295
Chapter 21: The 2020s	310

**ABREVIATURAS**

<b>2,4-D</b>	Ácido 2,4,diclorofenoxiacético
<b>AIB</b>	Ácido Indolbutírico
<b>ANA</b>	Ácido naftalenacético
<b>BA</b>	6 Benciladenina
<b>CAM</b>	Metabolismo ácido de las Crassuláceas
<b>CTV</b>	Cultivo de tejidos vegetales
<b>ES</b>	Embriogénesis somática
<b>HSP</b>	Heat Shock Protein
<b>KIN</b>	Kinetina
<b>MS</b>	Medio de cultivo Murashige y Skoog, 1962
<b>MS-B</b>	Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) modificado.
<b>OD</b>	Organogénesis directa
<b>OI</b>	Organogénesis Indirecta
<b>RCV</b>	Reguladores de crecimiento vegetal
<b>SH</b>	Medio de cultivo de Sheik y Hildebrandt



## RESUMEN

*Agave fourcroydes* o henequén, es una monocotiledónea que ha recobrado su importancia socioeconómica en la Península de Yucatán, por lo que se requiere de mejorar su suministro mediante herramientas eficaces de cultivo. Una de estas herramientas es la propagación clonal *in vitro*. En este trabajo se realizó un análisis de las características idóneas de diferentes materiales parentales a fin de potenciar el proceso de micropropagación del henequén. Para ello, se analizaron las características de diferentes materiales en relación con su comportamiento en la fase de inducción. Estos materiales provinieron de plantas propagadas convencionalmente de seis diferentes tallas, colectadas en diferentes meses del año, así como de plantas micropropagadas de diferentes tallas, propagadas por las vías de organogénesis y embriogénesis somática, y aclimatadas en invernadero y en vivero. Se realizaron estudios histológicos en aquellos tratamientos que presentaron diferencias significativas en cuanto a su eficacia. De todos los materiales estudiados, a lo largo de ocho semanas de cultivo, los promedios de producción más altos se observaron en plantas de tallas entre 20 y 29 cm (44.05 brotes por explante) y plantas de 35 s 40 cm producidas por organogénesis directa y aclimatadas en invernadero (26.66 brotes por explante). Los promedios de brotes por explante obtenidos en este trabajo son superiores a los reportados por otros autores para la especie. También se determinó que las plantas micropropagadas respondieron a las dos semanas de cultivo, a diferencia de las plantas convencionales, que respondieron a partir de la cuarta semana de cultivo, por lo que el origen de la zona meristemática influye en la velocidad de respuesta, razón por la cual la potenciación podría estar relacionada con la madurez de la zona meristemática.

The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the work during the year. It is followed by a detailed account of the various projects and the results achieved. The report concludes with a summary of the work done and the plans for the future.

**ABSTRACT**

*Agave fourcroydes* or henequen, is a monocot that has regained its economic importance in the Yucatan Peninsula, in what is required to improve their supply through efficient farming tools. One such tool is the clonal propagation *in vitro*. In this paper an analysis of the ideal characteristics of different parent materials in order to enhance the process of micropropagation of henequen was performed. To this end, the characteristics of different materials were analyzed in relation to their behavior in the induction phase. These materials came from conventionally propagated in six different sizes, collected in different months and micropopagated plants of different sizes, propagated pathways of organogenesis and somatic embryogenesis, and acclimatized in greenhouse and nursery. Histological studies were performed on those treatments that showed significant differences in their effectiveness. Of all the materials studied, over eight weeks of culture, the highest average production plants were observed in sizes between 20 and 29 cm (44.05 shoots per explant) and 35 plants 40 cm produced by direct organogenesis and acclimatized in a greenhouse (26.66 shoots per explant). The averages of shoots per explants obtained in this study are higher than those reported to the two weeks of culture, unlike conventional plants, respondents from the fourth week of culture, so that the origin of the meristematic zone influences the speed of response, reason why enhancement may be related to the maturity of the meristematic zone.



## CAPÍTULO I

### MARCO TEÓRICO

#### 1. INTRODUCCIÓN

El henequén (*Agave fourcroydes*), ha sido un factor importante en la historia de Yucatán, y ha estado ligado a la cultura maya, y que en la actualidad busca prevalecer su majestuosidad, elegancia y utilidad. Su historia comenzó desde la antigua civilización maya, y su mayor auge se inició a mediados del siglo XIX y duró un poco más de un siglo (ICY, 2006).

Esta importante especie nativa de la península de Yucatán, es un organismo perenne, que comercialmente se propaga únicamente por vía asexual, ya sea mediante la producción de hijuelos o de bulbillos. La producción de hijuelos es la forma de propagación única para la formación de semilleros y producción en campo en México. Por ello, alternativas biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales (CTV), ha estado produciendo resultados exitosos para su propagación comercial.

El CTV, tiene como base la capacidad de una célula para regenerar una planta completa. A este fenómeno se le conoce como totipotencialidad celular. Esta propiedad permite la propagación masiva de individuos elite en espacios reducidos y la propagación de líneas clonales de alta calidad.

El cultivo de tejidos ha sido aplicado a la propagación masiva de *A. fourcroydes* desde 1987 (Robert *et al.*, 1987). Desde entonces, esta técnica se ha aplicado a otras especies de agave, y se han realizado mejoras en el protocolo. Entre los cambios más importantes se encuentra el uso de la zona meristemática de plantas producidas por micropropagación y colocadas en condiciones de campo, como resultado se produjo una mayor cantidad de brotes en un tiempo significativamente menor.

Debido a la heterogeneidad de los cultivares de henequén, actualmente su producción es ineficiente, por ello se requiere mejorar los procesos de selección, el estudio los factores de resistencia a enfermedades y el rendimiento del proceso de propagación.

Por ello, el objetivo de este trabajo es estudiar las características del material parental que permita mejorar la producción de brotes en *A. fourcroydes* y de esta forma contribuir al mejoramiento del protocolo de micropropagación de esta especie. Para ello se comparó la producción de brotes en las zonas meristemáticas de plantas provenientes de cultivos en campo, colectadas en diferentes meses del año, (considerando la altura de los hijuelos) con la inducción de brotes provenientes de plantas producidas por embriogénesis somática (ES) y organogénesis directa (OD), aclimatadas en invernadero y en vivero.

## 2. ANTECEDENTES GENERALES

### 2.1 USO E IMPORTANCIA DEL HENEQUÉN.

La extracción de fibras naturales es una práctica llevada a cabo desde tiempos prehispánicos. En la actualidad, a pesar de que se utilizan otras especies de agave para la extracción de fibra como *A. angustifolia* cultivado en Oaxaca, *A. sisalana* o sisal cultivado en Chiapas y *A. angustifolia* var. *Deweyana* o zapupe cultivado en el sur de Tamaulipas y norte de Veracruz (García-Mendoza, 2007). También se han utilizado las fibras vegetales extraídas de otros géneros vegetales, como *Beschorneria*, *Furcraea*, *Hesperaloe*, y *Yucca* (García-Mendoza, 1998). Sin embargo, ha sido el género *Agave* el que ha resultado más exitoso debido a la calidad y cantidad de la fibra producida.

El género *Agave* presenta una amplia gama de usos dependiendo de la especie. Dentro de los usos actuales y más comunes se encuentra: la producción de bebidas como el pulque, tequila y mezcal; la extracción de fibras duras en seco y en enriado; para alimento, construcción y uso ornamental y medicinal (cutículas y jugos); forraje (inflorescencias y hojas); cercas vivas y combustible (García-Mendoza, 2004, 1998). Sin embargo la producción de bebidas y la extracción de fibras son los usos más importantes del género. Su uso como fibra, es el más importante en las zonas tropicales y subtropicales. Este cultivo tiene un elevado potencial de importación, particularmente por China (Lv *et al.*, 2009)

El henequén se encuentra dentro de los agaves de mayor importancia socioeconómica, junto con *A. tequilana*, *A. sisalana*, *A. angustifolia*, *A. salmiana*, entre

otros, debido a su uso integral (García-Mendoza, 1998). Sin embargo, el henequén se destaca por el uso de las fibras contenidas en sus hojas, recurso que es utilizado como material para construcción, producción de sogas, artesanías y algunos productos domésticos (Baña, 1999; Villanueva, 2009).

El henequén es originario de la península de Yucatán, y presentó una época de oro en su cultivo a partir de 1870 hasta la segunda mitad del siglo pasado. Ello colocó a la península de Yucatán en el primer lugar en la lista de productores de fibras duras del mundo. Este éxito provocó la multiplicación de áreas con cultivos de henequén (ICY, 2006). En 1955, de las 525,000 toneladas anuales de fibra producidas en México, 110,000 provenían del henequén (Bally y Tobler, 1955). La producción de fibra de henequén empezó a disminuir de forma significativa alrededor del año 1970 debido sobre todo al uso de fibras sintéticas y al mal manejo de la producción en el campo. Para 1980, la producción de fibra de henequén en Yucatán representaba ya solo el 11% de la producción mundial de fibra natural (Villanueva, 2009). En 1993 el estado de Yucatán disminuyó las zonas productoras de henequén, y se centró en reducir los costos de producción y en buscar métodos y técnicas para mejorar los cultivos con el fin de elevar la productividad de las cosechas (Colunga-GarcíaMarín y May-Pat, 1993).

Por otra parte, aunque la producción de fibra es el uso principal de esta especie, también se le utiliza para la producción de pulpa o bagazo para alimento para ganado (Harrison, 1985), en la obtención de sapogeninas a partir del jugo proveniente del prensado de las hojas, para la elaboración de hormonas corticoides semisintéticas (Herz, 1985), para la obtención de laminados de polietileno a partir de los residuos de fibras obtenidos en el proceso de enriado (Padilla y Fuentes, 1985), para la obtención de derivados de celulosa (Vieira y Heinze, 2002) y para la producción de energía (Escamilla-Treviño, 2012).

## **2.2 BIOLOGÍA DE *Agave fourcroydes***

*A. fourcroydes* es una planta monocotiledónea perteneciente al género *Agave* (del griego ἀγαυή, admirable) y a la familia Agavaceae, fue descrito por Carl Nilsson Linneaus en 1753. Se considera una especie nativa de la península de Yucatán, aunque se han

registrado cultivos en Cuba, Tamaulipas y Veracruz (SIAP, 2011). Se desarrolla en un clima cálido-seco, con precipitaciones pluviales inferiores a los 1,200 mm anuales y periodos moderados de sequía; crece en suelos pedregosos, permeables y ricos en materia orgánica, derivados de basalto y hierro (Guerrero-Medina *et al.*, 2011). Es una planta xerófila, perenne, monocárpica, posee raíz fibrosa y emite rizomas con hojas carnosas imbricadas y arrosetadas. Los ejemplares jóvenes presentan hojas revolutas en el extremo, ovadas, de colores verde azulado, estrechos hacia la base (Guillot *et al.*, 2009). Las hojas de los individuos adultos son sésiles, rígidas y suculentas de color verde opaco de hasta 160 cm de largo por hasta 15 cm de ancho, con una espina terminal fuerte de 5 cm. de longitud y numerosas espinas marginales de 2 cm de longitud (Silva, 1991). La floración se puede presentar desde los ocho hasta los 15 años. Es un organismo semélparo, que se caracteriza por contener un tallo semileñoso de 1 a 1.5 m de altura, el cual puede formar hasta 23 brazos en forma de espiga, presenta una inflorescencia de aproximadamente 7 metros. Sus flores presentan ovario inferotricarpelar, producen semillas planas de color oscuro. En la inflorescencia se puede presentar la formación de bulbillos o estructuras vegetativas que posteriormente se individualizan mediante la formación de raíces y producen un organismo completo e idéntico a la planta madre. Estos bulbillos pueden llegar a ser alrededor de 3,750 siempre y cuando se trate de una inflorescencia sana y vigorosa (Guerrero-Medina *et al.*, 2011; SIAP, 2011)

En lo que respecta a su relación filogenética, se considera a *A. fourcroydes* como especie domesticada de *A. angustifolia*. Según Colunga-GarcíaMarín, (1982) y Colunga-GarcíaMarín *et al.*, (1999), la propagación asexual de un solo cultivar de *A. angustifolia*, desde mediados del siglo ante pasado propicio la domesticación de la misma, de la cual se cultivaron tres variedades (Sac Ki, Yaak Ki y Kitam Ki), siendo Sac Ki el único cultivar sobreviviente hasta la fecha. Por otro lado, Piven *et al.*, (2001) mediante el estudio del desarrollo del micro y megasporofito de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia*, observaron que la estrategia de desarrollo del gametofito es similar en ambas especies. Se observó que en henequén, la formación del gametofito femenino y masculino se encuentra afectado por la gametogénesis asincrónica masculina y femenina así como por las alteraciones en la fertilidad del polen y el ovario.

### 2.3 PROBLEMÁTICA ACTUAL DEL CULTIVO DE HENEQUÉN

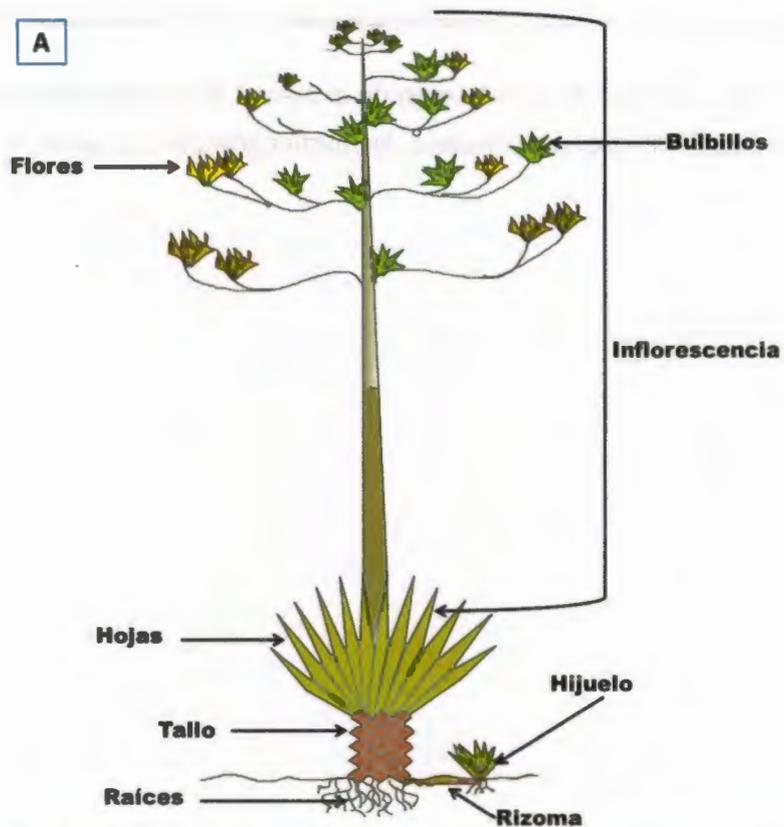
El henequén, comercialmente, es propagado principalmente por vía asexual o vegetativa, este proceso puede realizarse mediante el corte de bulbillos o estructuras vegetativas que se forman en las inflorescencias; éstos son colectados y posteriormente enraizados en semilleros (Guerrero-Medina *et al.*, 2011), como suele realizarse la propagación de sisal y del híbrido H 11648 en el este de África (Robert *et al.* 2004). Otra forma de propagación vegetativa es mediante el corte de hijuelos, en este caso, el tiempo de obtención de hijuelos es mucho menor al necesario para la obtención de bulbillos, por lo que el corte de hijuelos a partir de rizomas permite la formación de cultivos extensos. Esta vía de producción se practica desde hace cientos de años, con el objetivo de satisfacer la demanda de fibra henequenera.

La introducción de materiales sintéticos como el polietileno, más los desacuerdos e intereses políticos, desplazaron a la fibra natural por la fibra sintética, aunado a la transferencia de material vegetal a otros países, redujo gravemente la producción de fibra yucateca. Actualmente en México se siembran cerca de 19 mil hectáreas de henequén, mientras que en el año de 1980 la superficie alcanzaba 252 mil hectáreas (93% de disminución en 30 años). Hoy en día, el rendimiento del henequén es de  $0.5 \text{ ton ha}^{-1}$ , esta cifra equivale a una producción del 1.6% de fibra natural en el mundo, de la cual 5,000 ton provienen de henequén yucateco, y 30,000 ton de henequén tamaulipeco. Otros países productores de fibras naturales son Brasil, que produce cerca del 40% de la producción mundial (120,000 ton), China alrededor del 20% (60,000), Tanzania el 10% (30,000), Kenia el 8.3% (25,000) y Madagascar cerca del 3% (9,000) (SIAP, 2011).

De acuerdo con las cifras presentadas, resulta notorio que en la actualidad se ha recobrado el interés por el uso de fibras naturales, originado en la visión del uso de materiales orgánicos, y los beneficios para el medio ambiente. Este interés se encuentra principalmente en países desarrollados, en los cuales se busca reducir los contaminantes que provienen tanto del procesamiento de la fibra sintética, como de los residuos que se generan cuando ésta ya no es de utilidad (Guerrero-Medina *et al.*, 2011). Desde el año 2010 la demanda de fibras naturales abarca el 10% de la producción mundial de fibras duras y se abastece tanto con *A. sisalana* como con *A. fourcroydes* (FAO, 2010). Para

poder atender la demanda actual se requieren de al menos 20,000 toneladas de fibra. En Yucatán se producen 5 mil toneladas anuales, la cuarta parte del que se requiere producir (SIAP, 2011).





**Figura 1.1.** *Agave fourcroydes* de la Hacienda San Eduardo en Dzemul, Yucatán.  
 A) Esquema de las partes de una planta adulta de henequén. B) Bulbillos en inflorescencia.  
 C) Hijuelo en campo. D) Semillas. E) Rizoma con hijuelo en estado juvenil.

Esta baja productividad es una problemática que está asociada a la falta de individuos de alta calidad. Otro problema del cultivo es su exposición a siniestros naturales, como lo son fenómenos climáticos y desastres naturales, como huracanes e incendios. Por otro lado, la mayor parte de la producción obtenida se vende en el estado para ser transformada en las desfibradoras. Con el fin de agregar valor económico a la planta, se llevan a cabo dos procesos: la extracción de fibra (industria intermedia) y la manufactura de productos (industria final) (SIAP, 2011).

Esta problemática requiere de una atención urgente, ya que se existen 15 mil familias, en el estado de Yucatán, dependientes económicamente del henequén. Aunado a esto, el costo de la fibra nacional (7.00 pesos por kg) es menor que el precio de la fibra natural importada de África y Brasil. Sin embargo, no genera una competencia fuerte para la fibra extranjera, ya que las cantidades producidas por México, no abastecen la demanda del mercado nacional ni internacional (Alberto Méndez Martínez, encargado de la hacienda San Eduardo, Comunicación Personal 2013)

## **2.4 EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES (CTV)**

El cultivo de tejidos vegetales ha resultado eficaz para la resolución de problemas básicos en la biología vegetal, ofreciendo sistemas modelo para la investigación fisiológica, bioquímica, genética y estructural; por otro lado, la aplicación en la clonación, conservación y manipulación *in vitro* de material vegetal, así como la aplicación directa en la micropropagación, la generación de plantas libres de enfermedades y la conservación de germoplasma *in vitro* ha resultado de gran utilidad.

Esta tecnología basada en la totipotencialidad celular, es el conjunto de herramientas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de plantas completas a partir de células, tejidos, órganos, embriones o plantas completas cultivadas *in vitro* bajo condiciones asépticas, para el desarrollo de eventos organogénico, esto es la formación de órganos vegetales *de novo* a partir de tejido, tanto meristemático como no meristemático (Schwarz *et al.*, 2005), esta formación de órganos se lleva a cabo a partir del desarrollo de yemas o meristemas radicales y/o apicales, o partir de los explantes directamente o pasando por una estructura llamada callo. La producción de nuevas

plantas puede darse también a través del proceso de embriogénesis somática (ES), que es la formación de estructuras bipolares capaces de crecer y formar plantas completas, con un eje radical-apical, y que no poseen conexión vascular con el tejido materno (Litz y Jarret, 1991) ya sea por vía directa (producción de embriones a partir del explante) o por vía indirecta (producción de embriones a partir de callo). Esta última vía se caracteriza por la formación de una masa amorfa de células vegetales desdiferenciadas y de rápida proliferación (Pérez-Molphe *et al.*, 1999).

Neumann *et al.*, (2009), mencionan que existen diversos parámetros que definen el crecimiento, desarrollo y bioquímica de las células y tejidos en cultivo. Estos parámetros se pueden clasificar dentro de dos grupos, los factores endógenos y los factores exógenos. Dentro del primer grupo, se encuentra la planta que da origen a los explantes. El estado fisiológico del tejido y/o planta madre, así como las condiciones de crecimiento de la misma. Dentro de los factores exógenos, la lista es más amplia, ya que se encuentran los RCV, los nutrientes del medio de cultivo, la intensidad luminosa y la temperatura como entre otros.

## **2.5 LA MICROPROPAGACIÓN**

La micropropagación es el empleo de células, tejidos u órganos vegetales cultivados *in vitro* para la propagación masiva de líneas clonales en periodos cortos de tiempo. Uno de los objetivos más importantes de la micropropagación, es la producción de plantas de alta calidad y con estabilidad genética, es decir, que al tratarse de un sistema de propagación clonal, se mantienen las características genotípicas del material seleccionado. Otro aspecto es el potencial de producir plantas libres de virus y patógenos, permitiendo un mayor control de la dispersión de enfermedades (Cassells, 2005; Suttle, 2005).

La micropropagación, sin embargo, presenta desventajas como elevada inversión inicial que se requiere para montar el laboratorio, los requerimientos de personal altamente capacitado, y altos costos de producción (Robert *et al.*, 2004), además, al implementar el proceso de micropropagación de cualquier especie de interés, se debe de tener en cuenta no solo la producción masiva de plantas sanas y estables genéticamente,

sino el desarrollo *ex vitro* de las plantas producidas, así como de la progenie de las mismas (Cassells, 2005).

Inicialmente, se consideró que la micropropagación estaba formada por tres etapas. El establecimiento del cultivo aséptico (etapa I), seguido de la multiplicación de propágulos (etapa II), y finalizando con la preparación para el restablecimiento en suelo (etapa III) (Murashige 1974). Sin embargo, en la actualidad el proceso se divide en cinco etapas (Cassells 2005; Evans *et al.*, 2003; George y Debergh 2008; Robert *et al.*, 2004), que se explican a continuación:

**Etapa 0:** comprende la selección y preparación del material parental, así como el establecimiento de las condiciones asépticas que favorezcan la multiplicación *in vitro*. Esta etapa determinará la calidad del material micropropagado, por lo que es muy importante la buena selección del material parental. Esta selección conlleva el posible tratamiento sanitario del material, lo que puede implicar cuarentena y/o tratamientos con fungicidas, antibióticos o bactericidas para lograr la limpieza de las plantas madres, donadoras de los explantes.

**Etapa I:** comprende la iniciación de los cultivos asépticos, para ello se selecciona al explante adecuado, así como cabo diversas estrategias para eliminar los patógenos endógenos en el explante. Esta etapa concluye cuando el explante sano y limpio es colocado en el medio de inducción, en el cual se dará inicio al desarrollo de órganos por medio de los componentes del medio de cultivo, en especial los reguladores de crecimiento.

**Etapa II:** en esta etapa, el objetivo es lograr la producción masiva de brotes, por lo que se buscan las condiciones para la proliferación de brotes adventicios, a partir de una cantidad mínima de ellos. Este proceso puede ser repetitivo y se puede dar por tres vías: la organogénesis, la ES, ambas de forma directa o indirecta, y la multiplicación por yemas latentes.

**Etapa III:** comprende el crecimiento y enraizamiento de los brotes obtenidos en la fase anterior. Esto se logra mediante la elongación de los brotes con ayuda de RCV. Para el enraizamiento, en algunas ocasiones, es necesaria la adición de auxinas al medio

nutritivo para inducir la formación del sistema radical, aunque en la mayoría de los casos, se excluyen a los RCV durante la fase de enraizamiento.

Etapa IV: incluye la aclimatación, crecimiento y enraizamiento de las plántulas producidas en un medio *ex vitro*. En esta fase las plántulas deben volverse competentes para las condiciones *ex vitro*, como lo es la adaptación a cambios en la humedad relativa, capacidad fotosintética y paso a la autotrofia, así como resistencia a microorganismos potencialmente nocivos. Esta etapa determina el éxito real del proceso de micropropagación.

## **2.5 CULTIVO *in vitro* DEL GÉNERO *Agave*.**

Los estudios de cultivo *in vitro* en el género *Agave*, datan desde 1977, con el trabajo pionero de Groenewald *et al* (1977), en el cuál reportan la propagación a partir de semillas. Posteriormente los trabajos de Robert *et al* (1987) y Powers y Backhaus (1989) reportan la propagación *in vitro* de *A. fourcroydes* y *A. arizonica* respectivamente. Estos trabajos dan la pauta de una eficaz alternativa de propagación vegetativa para contrarrestar problemas del cultivo de especies de *Agave* de importancia ya sea ornamental o socioeconómica.

Las vías de regeneración *in vitro* experimentadas hasta la fecha han sido por organogénesis y embriogénesis somática, en ambos casos por vía directa e indirecta (Tabla 1.1). Esto ha causado diversos beneficios para la solución de problemáticas particulares de cada especie, ejemplo de ello se encuentra el trabajo de Martínez-Palacios *et al.* (2003) en el cual lograron la producción y germinación de embriones somáticos de callos a partir de segmentos de plántulas como fuente de explante de *A. victoriae-reginae*, una especie en peligro de extinción y endémica de México. El uso de 2.26  $\mu\text{M}$  de 2,4-D en medio MS para la inducción de embriones somáticos y 2.2 a 4.4  $\mu\text{M}$  de BA para la proliferación de brotes, fueron condiciones adecuadas para la propagación *in vitro* de esta especie.

En lo que respecta el estudio enfocado en la propagación vía organogénesis para el establecimiento de un gran número de individuos de forma continua, los trabajos de Groenewald *et al.* (1977) y Robert *et al.* (1987) sirvieron de base para el establecimiento

de condiciones adecuadas para la proliferación de brotes de forma directa. Posteriormente Das, 1992, logró la propagación a gran escala con *A. sisalana* mediante la formación de brotes vía directa. Sin embargo, de forma conjunta, los avances en el estudio del cultivo *in vitro* confirman que la respuesta morfogénica en el cultivo *in vitro* está altamente influenciada por el genotipo. Gaham y George (2008) explican que a menudo las condiciones del cultivo *in vitro* pueden ser diferentes no solo entre géneros y/o especies, sino entre variedades de la misma especie, esto ocasiona que se requieran diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento para la misma especie o incluso diferentes medios de cultivo. Como se observa en la Tabla 1.1, el uso de reguladores de crecimiento se enfoca en combinaciones menores de auxina que de citocinina. Es notorio que las altas concentraciones de citocinina y en especial BA ha resultado exitoso para la proliferación de brotes vía directa. Este efecto se puede observar en la respuesta de diferentes tipos de explantes, como meristemos, hijuelos, tallos y maduración de embriones somáticos.

Lo avances en la capacidad organogénica del tejido meristemático del género *Agave*, le han permitido funcionar como un modelo de estudio para la resolución de incógnitas de la tecnología del cultivo *in vitro*, tal es el caso de *A. tequila*, que sido utilizado para el estudio del papel de la glutamato deshidrogenasa en el proceso de vitrificación de los brotes, en relación con la concentración de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo (Castro-Concha *et al.*, 1990). Así como modelo para el estudio del efecto de la aplicación de luz blanca o roja en la fase de inducción para la germinación de embriones (Rodríguez-Sahagún *et al.*, 2011).

Por otro lado, los avances para la elucidación de la ruta biosintética de las sapogeninas a partir la producción e incremento de hecogenina (una de las materias primas más importantes para la producción de medicamentos en China) mediante altas concentraciones de cobre en el medio de cultivo a se ha realizado en *A. amaniensis* (Andrijany *et al.*, 1999; Kartosentono *et al.*, 2002).

Los estudios realizados en *A. fourcroydes* se reportan a partir 1987. En el trabajo pionero de Robert *et al.* (1987) en donde se reportan las condiciones adecuadas para la producción de brotes. Sin embargo, en los posteriores trabajos se han usado

preferencialmente plantas madre con talla mayor a 40 cm de altura (Robert *et al.*, 1992, 2006), por lo que no se descarta la posibilidad de que el uso de material joven como fuente de explante, pueda dar mejores resultados en la propagación *in vitro* de la especie. Actualmente, solo existen un reporte sobre la respuesta morfogénica en relación con el uso de diferentes tallas de plantas, este trabajo realizado por Carballo *et al.* (2010) reporta condiciones similares a Robert *et al.* (1987), sin embargo, el promedio de brotes por explante se encuentra por debajo de los reportado Robert *et al.* (1987, 1992, 2006).

El trabajo más reciente respecto al tipo es explante para el proceso de micropropagación de *A. fourcroydes*, fue el realizado por Monja-Mio y Robert, (2013) en el cual a partir de cortes transversales (Thin Cell Layer) de plantas *in vitro* se logró la inducción directa de embriones somáticos en medio MS-B adicionado con 2.26 de dicamba (92.22 embriones/explante) o con 2.07 de picloram (81.72 embriones/explante). Este trabajo es crucial para el incremento en la producción de plántulas de alta calidad. De acuerdo al rendimiento en campo de plantas producidas por cultivo *in vitro*, los estudios realizados en *A. fourcroydes* muestran un incremento en el tiempo de desarrollo de las plantas, de forma que a lo largo de 3 años de cultivo en campo, el aprovechamiento de las hojas se incrementa hasta un 48% (81 hojas por planta). Por otro lado, las plantas micropropagadas en campo, han mostrado mayor vigor y menor susceptibilidad a enfermedades microbianas (Eastmond y Robert, 2000). Por lo que el estudio de las características del material parental de las plantas madre elite. Es crucial para el mejoramiento del protocolo de micropropagación de esta especie

Debido a su capacidad regenerativa y a los avances en su propagación *in vitro*, *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* ha sido utilizado para el estudio de mecanismos epigenéticos ocurridos en cultivo *in vitro* de *Agaves* como lo son la metilación de ADN y modificaciones en las histonas, donde se ha observado que los clones de *Agave* presentan una alta metilación del ADN y expresiones diferenciales en la expresión del gene KNOX1 durante las condiciones *in vitro*, las cuales regulan mecanismos epigenéticos. La importancia de esto es la futura generación de individuos resistentes involucrando, estudios de diferenciación celular, adaptación y evolución de la plantas (De la Peña *et al.*, 2012; Niccan y Peña, 2012)

Tabla 1.1. Trabajos de regeneración *in vitro* realizados *Agave spp*

Referencia	Especies reportadas	Explante utilizado	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento ( $\mu\text{M}$ )	Respuesta
Robert <i>et al.</i> , 1987	<i>A. fourcroydes</i>	Tallo	MS-B	0.11 de 2,4-D y 44 BA	OD
Powers y Backhaus, 1989	<i>A. arizonica</i>	Base de hoja de bulbilos	MS	44.4 BA y 5.4 ANA	OD
Binh <i>et al.</i> , 1990	<i>A. cantala</i> <i>A. fourcroydes</i> <i>A. sisalana</i>	Rizomas de plántulas	MS	0.39 de ANA, 0.49 de IBA y 2.25 de Kin	OI
Das, 1992	<i>A. sisalana</i>	Rizomas	MS y SH	22.2 de BA	OD
Robert <i>et al.</i> , 1992	<i>A. fourcroydes</i> <i>A. sisalana</i> <i>A. tequilana</i>	Segmentos de tallo Rizoma y cuerpos axilares	MS-B	0.11 de 2,4-D y 44 de BA	OD.
Hazra <i>et al.</i> , 2002	<i>A. sisalana</i>	Rizoma	SH	22.20 o 44 de BA	OD:
Nikam, 1997	<i>A. sisalana</i>	Rizoma	MS	6.9 de Kin	OI
Santacruz-Ruvalcaba <i>et al.</i> , 1999	<i>A. parrasana</i>	Hojas	MS	13.3 de BA	OD
González <i>et al.</i> , 2004	<i>A. fourcroydes</i>	Rizoma	MS-B	0.45 a 9.05 de 2,4-D, 22.2 a 88.8 de BA y Kin	ES

Nikam, 2003	<i>A. sisalana</i>	Bulbillos	MS	4.60 de Kin ó 1.32 de ANA y 4.4-6.6 BA	ES
Enriquez del Valle <i>et al.</i> , 2005	<i>A. angustifolia</i>	Tallos	MS	4.44 de BA	OD
Robert <i>et al.</i> , 2006	<i>A. fourcroydes</i> <i>A. tequilana</i> , <i>A. angustifolia</i> <i>A. sisalana</i> ,	Rizoma	MS-B	0.11 de 2,4-D y 44 de BA	OD.
Valenzuela-Sánchez <i>et al.</i> , 2006	<i>A. tequilana</i>	Segmentos de hojas	MS	1.1 de 2,4-D y 44 de BA	OI
Silos-Espino <i>et al.</i> , 2007	<i>A. salmiana</i>	Meristemas	MS	8.88 de BA y 1.43 e AIA	OD
Carballo <i>et al.</i> , 2010	<i>A. fourcroydes</i>	Hijuelos	MS-B	0.11 de 2,4-D y 44 de BA	OD
Aureoles-Rodríguez <i>et al.</i> , 2008	<i>A. inaequidens</i>	Tallos	MS	1.47 de AIB y 4.44 de BA	OD
Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011	<i>A. angustifolia</i>	Embriones cigóticos	MS	13.56 de 2,4-D y 4.4 de BA	ES
Monja-Mio y Robert, 2013	<i>A. fourcroydes</i>	Base de plántulas <i>in vitro</i>	MS-B	2.26 de Dicamba o 2.07 de Picloram	ES

. I: Organogénesis Indirecta; O. D: Organogénesis Directa; E. S: Embriogénesis Somática

### 3. JUSTIFICACIÓN.

La demanda actual de fibras naturales, entre ellas las provenientes del henequén, ha puesto una importante presión en los sistemas de producción actuales, así como una importante demanda en material vegetal de calidad para su producción. En el caso de México, el sisal y el henequén son las especies que usan principalmente para la producción de fibra. Tanto la propagación de la planta, como la extracción de la fibra se realizan de la misma forma que hace 50 años, con la misma tecnología obsoleta, lo que ha llevado a una baja productividad y eficiencia. Para poder cumplir con la demanda del mercado de henequén, se requiere competitividad en la producción, mediante la transferencia de tecnología que permita a los productores hacer un manejo eficiente y a bajo costo. Por ello, es necesario mejorar las características del material parental utilizado en el proceso de producción de las plantas utilizadas como materia inicial para la producción de plantas de campo. La micropropagación es una alternativa eficiente de propagación de individuos de alta calidad.

### 4. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

#### PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Las plantas obtenidas por cultivo *in vitro* tienen mayor potencial regenerativo que las plantas obtenidas convencionalmente?

¿El origen del material parental (cultivado en campo o cultivado *in vitro*) influye directamente en la producción de brotes en el proceso de micropropagación de *Agave fourcroydes*?

¿La talla de las plantas y las condiciones de colecta del material parental pueden favorecer la producción de brotes en *Agave fourcroydes*?

¿El lugar de aclimatación (invernadero o vivero) de la plantas influye en la capacidad regenerativa del material parental?

## HIPÓTESIS

La producción de brotes a partir de la zona meristemática de plantas cultivadas *in vitro* es más eficiente que la producción de brotes de la zona meristemática de plantas regeneradas de tejido madre convencional.

## 5. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar las características de diferentes materiales parentales en la respuesta organogénica *in vitro*, mediante la inducción de plantas de diferentes tallas cultivadas en campo y colectadas en diferentes meses del año, como plantas cultivadas *in vitro*, de diferentes tallas aclimatadas en vivero e invernadero, para la potenciación del protocolo de micropropagación de *Agave fourcroydes* Lem.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar la capacidad organogénica de plantas propagadas convencionalmente de seis diferentes tallas.
- 2) Estudiar la influencia del mes de colecta de plantas propagadas convencionalmente, en la inducción de brotes adventicios.
- 3) Determinar la capacidad organogénica de plantas, producidas por cultivo *in vitro*, de diferentes tallas, aclimatadas tanto en invernadero como en vivero.
- 4) Determinar la eficiencia en la producción de brotes de plantas obtenidas por organogénesis directa o por embriogénesis somática en la obtención de brotes.
- 5) Comparar la producción de brotes a partir de tejido meristemático de plantas propagadas de forma convencional, con la producción de brotes de plantas provenientes por cultivo *in vitro*.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El procedimiento general que se llevó a cabo para el cumplimiento de los objetivos se muestra en el siguiente esquema. El material vegetal se obtuvo de dos orígenes diferentes. El primer grupo de plantas se conformó por plantas propagadas de forma convencional en campo. Estas plantas fueron clasificadas en seis rangos diferentes de talla. La colecta de todas las alturas se realizó en los meses de agosto y noviembre de 2012 y febrero y agosto de 2013.

El segundo grupo de material vegetal provino de plantas regeneradas *in vitro* tanto por vía organogénica como por vía embriogénica. Las plantas producidas de esta forma fueron aclimatadas en condiciones de invernadero durante nueve meses, y posteriormente se transfirieron a condiciones de vivero. En ambos grupos de plantas, para la inducción de los brotes, se usó el meristemo apical.

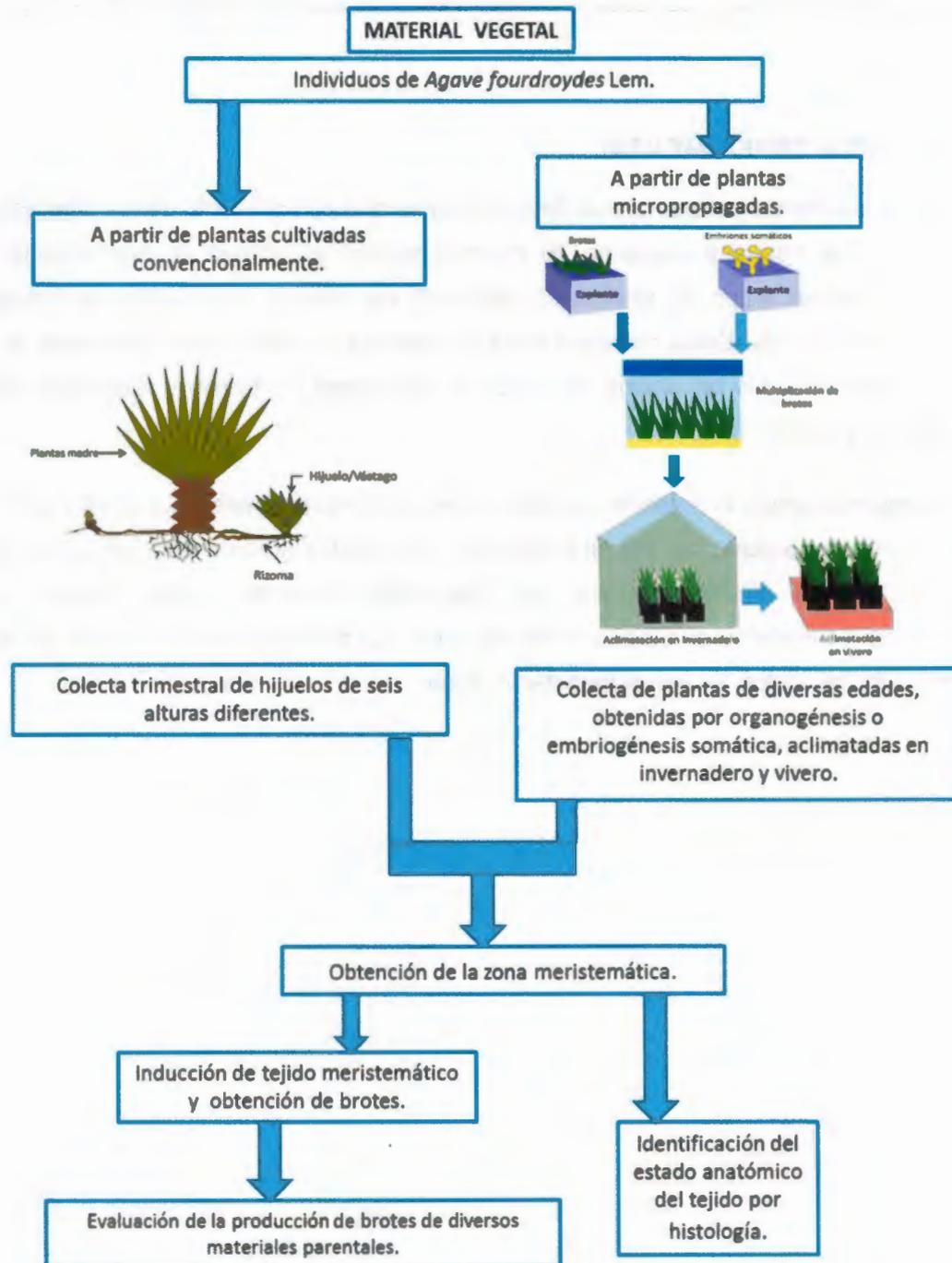


Figura 1.2. Estrategia experimental.

---

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Andrijany, V.S., G. Indrayanto, L.A. Soehono (1999). Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt ions on saponin steroids content in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 55, 103–108.
- Arzate-Fernández, A. R. Mejía-Franco (2011). Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista. Fitotecnia de México* 34, 101–106.
- Bally, W., F. Tobler (1955). *Hard Fibres*. *Eco* 9, 376–399.
- Baña, R.O. (1999). El cultivo del henequén (*Agave fourcroydes*, Lem) como planta textil y su aprovechamiento integral. *Temas. Universidad Tecnológica la Mix.* 9, 23–30.
- Binh, L.T., L.T. Muoi, H.T.K. Oanh, T.D. Thang, D.T. Phong (1990). Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture.* 23, 67–70.
- Carballo, M.G., G.G. Oramas, S.A. García, E.S. Cruz, K.Q. Bravo, P.D.S. Caligari, R. García-González (2010). Management of auxin.cytokynin interactions to improve micropropagation protocol of henequen (*Agave fourcroydes* Lem.). *Chilean Journal Agriculture Research* 70, 545–551.
- Cassells, A.C. (2005). Principles of Micropropagation, in: Munich, S., Sakena, P. (Eds.), *Journey of a Single Cell to a Plant*. Science Publishers, pp. 287–308.
- Castro-Concha, L., V. M. Loyola-vargas, J.L. Chan, M.L. Robert (1990). Glutamate dehydrogenase activity in normal and virified plants of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 22, 147–151.
- Colunga-GarcíaMarín, P. (1982). The Domestication of Henequen (*Agave fourcroydes* Lem) 439–446.
- Colunga-GarcíaMarín, P., J. Coello-coello, L. Eguiarte, D. Pinero (1999). Isozymatic Variation and Phylogenetic Relationships between Henequen (*Agave fourcroydes*)

- and its wild ancestor *A. angustifolia* (Agavaceae). *American Journal of Botany*. 86, 115–123.
- Colunga-GarcíaMarín, P., F. May-Pat (1993). Present germplasm diversity and uses. *Economy Botany* 47, 312–327.
- Das, T. (1992). Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 31, 253–255.
- De-la-Peña, C., G. Nic-Can, G. Ojeda, J.L. Herrera-Herrera, A. López-Torres, K. Wrobel, M.L. Robert-Díaz (2012). KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave* spp. *BMC Plant Biol.* 12, 203.
- Domínguez, M., A. Alpuche, N. Vasco, E. Perez-Molphe (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia de Mexico*. 31, 317–322.
- Eastmond, A., M.L. Robert (2000). Henequen and the Challenge of Sustainable Development in Yucatan , Mexico. *Biotechnology of Development Monit.* 41:1–5.
- Escamilla-Treviño, L.L. (2012). Potential of Plants from the Genus *Agave* as Bioenergy Crops. *BioEnergy Res.* 5, 1–9.
- Evans, D., J. Coleman y A. Kearns. (2003). *Plant Cell Culture*, First Edit. ed. Bios Scientific.
- Gaham, P.B., E.F. George (2008). Adventitious Regeneration, in: Goerge, E., Hall, M., Klerk, G. De (Eds.), *Plant Physiology and Biochemistry*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 355–380.
- García-Mendoza, A. (1998). *Con sabor a maguey*. Universidad Nacional Autónoma de México-Sistemas de Información Geografica, S.A. de C. V., Distrito Federal, México.
- García-Mendoza, A. (2004). Agaváceas, en: García-Mendoza, A.J., Ordoñez, M.J., Briones-Salas, M. (Eds.), *Biodiversidad de Oaxaca*. Universidad Nacional Autónoma

- de México-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Eildlife Fund, Distrito Federal, México, pp. 159–169.
- García-Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias* 87, 14–23.
- George, E.F., W. Davies (2008). Effects of the Physical Environment, in: George, E., Hall, M., Klerk, F. De (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 423–464.
- George, E.F., P.C. Debergh (2008). Micropropagation: uses and Methods, in: George, E., Hall, M., Klerk, G. De (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 29–64.
- González, G., S. Alemán, R. Trujillo, M. Keb, E. Abreu, F. Barredo, M.L. Robert, R. Ortiz, M.T. Cornides (2004). El cultivo *in vitro* como alternativa de la recuperación henequenera (*Agave fourcroydes*). *Biotecnol. Apl.* 21, 44–48.
- Guerrero-Medina, R., R. Díaz-Plaza, J. Ferral-Piña (2011). Paquete Tecnológico Henequén *Agave fourcroydes* Producción de planta. SAGARPA-INIFAP, Mérida, Yucatán, México.
- Guillot, D., P. Meer, E. Van der Laguna, J. Rosselló (2009). El género *Agave* L. en la flora alóctona valenciana, 3rd ed. Jolube Editor y Consultor Ambiental.
- Harrison, D.G. (1985). The use of sisal by products as feeds for ruminants, in: Cruz, C., Castillo, L. Del, Robert, M., Ondarza, R. (Eds.), *Biología Y Aprovechamiento Integral Del Henequén Y Otros Agaves*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Mérida, Yucatán, México, p. p.
- Hazra, S.K., S. Das, A.K. Das (2002). Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 3, 235–240.
- Herz, J. (1985). Modificación y recuperación de esteroides del henequén, in: Cruz, C., Castillo, L. Del, Robert, M., Ondarza, R. (Eds.), *Biología Y Aprovechamiento Integral*

---

Del Henequén Y Otros Agaves. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Mérida, Yucatan, México.

- Kartosentono, S., G. Indrayanto, N.C. Zaini (2002). The uptake of copper ions by cell suspension cultures of *Agave amaniensis*, and its effect on the growth, amino acids and hecogenin content. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 68, 287–292.
- Litz, R., R. Jarret (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogenesis, in: Roca, W., Mroginski, L.- (Eds.), *Cultivo de Tejidos En La Agricultura: Fundamentos Y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, pp. 143–161.
- Luján, R., F. Lledías, L.M. Martínez, R. Barreto, G.I. Cassab, J. Nieto-Sotelo (2009). Small heat-shock proteins and leaf cooling capacity account for the unusual heat tolerance of the central spike leaves in *Agave tequilana* var. Weber. *Plant. Cell Environ.* 32, 1791–803.
- Lv, L., G. Sun, J. Xie, X. Zang, Y. Hu, J. Duan (2009). Determination of chromosomal ploidy in *Agave* ssp . *African J. Biotechnol.* 8, 5248–5252.
- Martínez-Palacios, A., P. Ortega-Larrocea, V. Chávez, R. Bye (2003). Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 74, 135–142.
- Monja-Mio, K.M. (2013). Embriogénesis somática de *Agave* en biorreactores de inmersión temporal. Centro de Investigación Científica de Yucatan, A.C.
- Monja-Mio, K.M. y M.L. Robert (2013). Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 49, 541–549.
- Murashige, T. (1974). Planr propagation through tissue cultures. *Annu. Rev. Plan Physiol.* 25, 135–166.

- Neumann, K., A. Kumar, J. Imani (2009). *Plant Cell and Tissue Culture- A tool in Biotechnology*. Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Nic-Can, G.I., C. De la Peña (2012). Determinacion of Histona Methylation in mono and dicotyledonous plants. *Plant Cell Cult. Protoc, Methods in Molecular Biology* 877, 313–324.
- Nikam, T.D. (1997). High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 51, 225–228.
- Padilla, A., P. Fuentes (1985). Laminados de polietileno-henequén, in: Cruz, C., Castillo, L. Del, Robert, M., Ondarza, R. (Eds.), *Biología Y Aprovechamiento Integral Del Henequén Y Otros Agaves*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Mérida, Yucatán, México.
- Pérez-Molphe, E.M., R. Ramírez-Malagón, H.G. Muñoz-Palenius, N. Ochoca-Alejo (1999). *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico.
- Piven, N., F. Barredo-Pool, I. Borges-Argáez, M. Herrera-Alamillo, A. Mayo-Mosqued, J. Herrera-Herrera, M.L. Robert (2001). Reproductive biology of henequen and its wild ancestor (*Agave fourcroydes*) *Agave angustifolia* (Agavaceae ). *Am. J. Bot.* 88, 1966–1976.
- Rendón, L. (2007). Relación entre la edad del henequén (*Agave fourcroydes* Lem) y la estacionalidad climática anual en la producción de destilado alcohólico. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. 127p.
- Robert, M., J. Herrera, F. Chan, F. Contreras (1992). Micropropagation of *Agave* spp. *Biotechnol. Agric. For.* 19, 306–329.
- Robert, M., J. Herrera, F. Contreras, K. Scorer (1987). *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 8, 37–48.

- Robert, M.L., J.L. Herrera-Herrera, E. Castillo, G. Ojeda, M.A. Herrera-Alamillo (2006). An efficient method for the micropropagation of *Agave* species. *Methods Mol. Biol.* 318: 165–178.
- Robert, M.L., J.L. Herrera-Herrera, M.A. Herrera-Alamillo, A. Quijano-Ramayo, U.E. Balám (2004). Manual for the *in vitro* culture of Agaves 38. 145p.
- Rodríguez-Sahagún, A., G. Acevedo-Herna, J. Rodríguez-Domínguez, B. Rodríguez-Garay, J. Cerbantes-Martínez, O.A. Castellanos-Hernández (2011). Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var . Azul. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 104:271–275.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., H. Gutiérrez-Pulido, B. Rodriguez-Garay (1999). Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 56:163–167.
- Schwarz, O.J., A.R. Sharma, R.M. Beaty (2005). Propagation from nonmeristematic tissues: Organogenesis, in: Trigiano, N., Gray, D. (Eds.), *Plant Development and Biotechnology*. U.S.A. 378p.
- Silva, J. (1991). Propagación *in vitro* de plantas elite de *Agave fourcroydes* L. a partir de tejidos de tallo y rizoma. Instituto Tecnológico Agropecuario No.2.
- Suttle, G.R. (2005). Commercial laboratory production, in: Trigiano, R.N., Gray, D.J. (Eds.), *Development and Biotechnology*. CRC Press, U.S.A., pp. 311–320.
- Valenzuela-Sánchez, K.K., R.E. Juárez-Hernández, A. Cruz-Hernández, V. Olalde-Portugal, M.E. Valverde, O. Paredes-Lopez (2006). Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 42:336–340.
- Vieira, M.C., T. Heinze (2002). Cellulose derivatives from cellulosic material isolated from *Agave lechuguilla* and *A. fourcroydes*. *Cellulose* 9:203–212.
- Villanueva, E. (2009). *El fin del oro verde: conflicto social y movimiento campesino 1960-2008*, Primera. ed. Mérida, Yucatan, México. 288p.

**PAGINAS WEB:**

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Información, 2014. Yucatán: Territorio: Clima [Online].

Disponible en:

<http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/yuc/territorio/clima.aspx?tema=me&e=31>

[Acceso 25 marzo 2014]

Estación meteorológica del CINVESTAV, Telchac, 2014. Telchac puerto. [Online].

Disponible en: [http://www.mda.cinvestav.mx/weather2/Current\\_Vantage\\_Pro.htm](http://www.mda.cinvestav.mx/weather2/Current_Vantage_Pro.htm)

[Acceso en Junio de 2014]

FAO, 2010. [Online]

Disponible en: [http://www.fao.org/corp/topics/topics\\_result/es/?lang=es&main\\_id=6](http://www.fao.org/corp/topics/topics_result/es/?lang=es&main_id=6).

[Acceso en mayo de 2012]

SIAP-SAGARPA 2011. Monografía del henquén y el sisal. Financiera Rural. [Online]

Disponible en.

<http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaDeHenequ%C3%A9nSisal%28ago11%29.pdf>

[Acceso en Junio de 2014]

## CAPÍTULO II

### EFFECTO DE LA TALLA Y LAS CONDICIONES AMBIENTALES DE COLECTA EN LA PRODUCCIÓN DE BROTES *in vitro* EN *Agave fourcroydes* Lem.

#### 1. INTRODUCCIÓN.

Se ha confirmado que la selección clonal es una posibilidad real para el rápido desarrollo y obtención de plantas de *A. fourcroydes*, con mayor contenido y calidad de fibra, así como hojas más largas, razón por la cual la producción puede ser duplicada en poco tiempo (Eastmond y Robert, 2000). Sin embargo, la calidad de los individuos seleccionados está fuertemente ligada con factores ambientales.

Las condiciones ambientales como la precipitación, la temperatura y la radiación fotosintéticamente activa, impacta en la capacidad fotosintética en los agaves (Nobel, 1990). Por otra parte, Rendón (2007), reporta el efecto de la estacionalidad climática anual en la producción de destilado alcohólico en relación la la edad fisiológica de plantas de *A. fourcroydes*, en la cual, las alteraciones que se presentaron en el ambiente, se vieron reflejadas en las plantas estudiadas. Según lo reportado por Guerrero-Medina *et al.*, (2011), si bien la exigencia de humedad de *Agave fourcroydes* es baja, se ha observado que las condiciones extremas afectan la productividad de la planta, retrasando su tiempo de producción de hojas, y ocasionando mermas en los ingresos económicos obtenidos del cultivo. Con estos reportes, se observa que *A. fourcroydes* presenta cierta susceptibilidad a los cambios ambientales.

En los últimos diez años, según los datos de precipitación y temperatura reportados por la estación meteorológica del CINVESTAV Telchac, la variación climática de la Península de Yucatán ha sido fluctuante, observándose precipitaciones no constantes. Esto puede estar causando efectos en el desarrollo de los hijuelos. Sin embargo, se desconoce hasta qué punto estos cambios ambientales puede afectar la capacidad de respuesta organogénica de la zona meristemática. En estudios previos realizados con *A. tequilana*, se observó una mayor producción de brotes por explante en plantas colectadas, como material parental, en los meses de julio y agosto (Robert *et al.*, 1992); estos meses corresponden a los meses de más lluvias de ese año.

El objetivo de la investigación presentada en este capítulo es el determinar la capacidad organogénica de diferentes tallas de plantas propagadas convencionalmente, así como la influencia estacional en dicho proceso.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 2.1 CARACTERÍSTICAS DEL MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron hijuelos de *A. fourcroydes* Lem. provenientes de plantas madre cultivadas en el campo y propagadas por la vía tradicional de rizoma en la hacienda San Eduardo (Figura 2.1) ubicada en el municipio de Dzemul, Yucatán a 1 msnm, log 89°16'37''O y latitud 21°14'03''N

Durante la colecta en campo, se seleccionaron plantas madre con una altura mínima de 1.65 metros, hojas grandes y vigorosas y en lo posible libres de daño mecánico o de algún microorganismo. Una vez seleccionada la planta madre de los hijuelos, se llevó a cabo la colecta de los mismos.



**Figura 2.1.** Lugar de colecta de los hijuelos. A) Medición y selección de hijuelos. B) Planta madre con hijuelos a su alrededor C). Planta desfibadora de la Hacienda San Eduardo D) Cultivo de henequén de la Hacienda San Eduardo.

### 2.2. CLASIFICACIÓN POR TALLA DE LOS HIJUELOS

Se tomaron en cuenta seis rangos de talla de los hijuelos (Figura 2.2), tomando en consideración los antecedentes reportados por Robert *et al*, (1987, 1995, 2004), de las cuales se clasificaron en seis grupos (<10 cm; 11-19 cm; 20-29 cm; 30-39 cm; 40-49 cm;

50-39 cm). Para todos los casos, la caracterización morfológica se realizó tomando en cuenta el número de hojas sanas, ancho de la base, longitud, diámetro y peso de la piña o tallo, y largo, ancho y peso de las cuatro hojas más jóvenes y cercanas a la hoja espada de los hijuelos. Las plantas colectadas provinieron de diferentes plantas madre.



**Figura 2.2.** Aspecto de los hijuelos por cada rango de altura.

### 2.3 COLECTA TRIMESTRAL DE HIJUELOS.

Para conocer el efecto estacional en el establecimiento *in vitro* de los hijuelos cultivados en campo, la colecta trimestral se realizó en cuatro ocasiones, para de cada uno de los grupos de altura establecidos anteriormente. Se colectaron 20 individuos para cada caso, los cuales fueron sometidos al proceso de micropropagación. Las colectas se realizaron en los meses de agosto y noviembre del año 2012, febrero y agosto de 2013.

### 2.4 OBTENCIÓN DEL COGOLLO.

Después de la colecta, los hijuelos permanecieron en un lugar sombreado, fresco y protegidos de depredadores, por un máximo de cuatro días previos a su procesamiento. Posteriormente, con un cuchillo con filo se cortaron las raíces (en caso de plantas de más de 30 cm de altura, fue necesario el corte de la base del tallo). Las hojas más externas, se cortaron una a una, haciendo una incisión en las zonas que abrazan el tallo y cortando con cuidado, sin arrancar, tomando como referencia el término de la zona de color verde

de la hoja. (Figura 2.3A). Se retiraron todas las hojas, y una vez obtenido el cogollo (Figura 2.3B), se registró su longitud, diámetro y peso, y se colocó en un recipiente etiquetado con la clave de la planta para su posterior lavado.



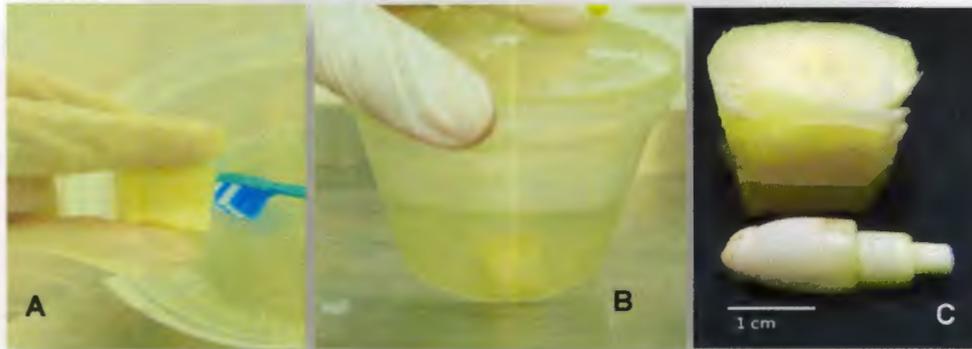
**Figura 2.3.** Cogollo de plantas colectadas. A) Corte de hojas de la planta. B) Cogollo.

## 2.5. PROCESO DE LAVADO Y DESINFECCIÓN DEL COGOLLO.

Los cogollos fueron sumergidos en una solución desinfectante compuesta de 2% (v/v) de hipoclorito de sodio (Cloro comercial), 2% (v/v) de Extran (detergente) y 2 gotas de Tween 80 por cada litro de solución. Con un cepillo dental se talló el cogollo vigorosamente, y se enjuagó con agua destilada (Figura 2.4A). Posteriormente, los cogollos fueron sumergidos por 15 minutos en la solución desinfectante mencionada anteriormente (Figura 2.4B).

Posteriormente, el cogollo fue retirado de la solución desinfectante y enjuagado tres veces con agua destilada y esterilizada. En caso de que el cogollo fuera mayor a 7 cm, sobre sanitas estériles y con el uso de un bisturí se cortaron los extremos de las hojas externas, dejando el cogollo en forma de cubo (Figura 2.4C). Éste fue colocado en un frasco estéril y etiquetado con la clave correspondiente, para ser introducido en condiciones asépticas en campana de flujo laminar.

Dentro de la campana de flujo laminar, se preparó la cantidad necesaria de hipoclorito de sodio al 40% (v/v). Los cogollos se colocaron en frascos estériles, y se colocaron en la solución de hipoclorito de sodio por diferentes tiempos (Tabla 2.1).



**Figura 2.4.** Lavado del cogollo. A) Cepillado del explante. B) Agitación en solución desinfectante. C) cogollos de henequén (superior, planta de 20.29 cm; inferior, planta de 10 cm)

**Tabla 2.1.** Tiempo de inmersión en NaClO al 40% (v/v) de los diferentes cogollos utilizados para la propagación.

Longitud del cogollo (cm)	Diámetro del cogollo (cm)	Tiempo de inmersión (min)
1-1.5	0.5-0.9	15
1.6-2.5	1-2	20
<2.5	<2	30

Transcurrido el tiempo de inmersión, se realizaron tres enjuagues con agua destilada y estéril, agitando un minuto en cada enjuague. Posteriormente, el cogollo desinfectado se colocó en un frasco estéril para su posterior corte e inducción.

## 2.6 CORTE E INDUCCIÓN DE EXPLANTES.

Una vez que el tejido fue desinfectado, se realizaron los cortes necesarios para eliminar el tejido foliar y el tejido afectado por el cloro, y así obtener cubos de aproximadamente  $0.8 \text{ cm}^3$ . En caso de no contar con suficiente tejido, se registró el tamaño del explante obtenido menor a  $0.8 \text{ cm}^3$ . El proceso de micropropagación se llevó a cabo siguiendo el protocolo reportado por Robert *et al.*, (1987, 1992 y 2004).

1. Inducción de brotes por vía directa. Los cubos fueron colocados en medio MSB [sales del medio Murashige y Skoog (1962), (MS), con nitrógeno reducido (10 mM  $\text{KNO}_3$  y 5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )] , adicionado con 0.112  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 44 $\mu\text{M}$  de BA y 1.1% de agar, pH ajustado a 5.75, cultivado durante cuatro semanas en condiciones de luz continua a una intensidad luminosa de 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$  bajo  $25 \pm 2$  °C.
2. Multiplicación de brotes. Los brotes fueron colocados en medio MSB, adicionado con 0.112  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 44  $\mu\text{M}$  de BA, 0.3 % de agar y 0.3 % de Gelrite, cultivados por cuatro semanas en condiciones de fotoperiodo de 16 h luz, bajo una intensidad luminosa de 45  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$  bajo  $25 \pm 2$  °C
3. Cultivo de los brotes. Los brotes fueron colocados en medio MSB, adicionado con 0.112  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 0.44  $\mu\text{M}$  de BA, 0.3% de agar y 0.3% de Gelrite, cultivados hasta por 4 semanas.
4. Enraizamiento de las plántulas. Las plántulas fueron colocadas en medio MS a la mitad de su fuerza iónica, adicionado con tiamina 0.01%, ácido nicotínico 0.15% y piridoxina-HCl 0.05%, con 30  $\text{gL}^{-1}$  de sacarosa y 0.4% de agar.
5. La aclimatación se realizó en suelo compuesto por tierra y sunshine 2:1 en charolas de 70 pozos

## 2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de la caracterización morfológica de los hijuelos provinieron de las 20 plantas colectadas por cada talla en cada mes de colecta, éstos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis. La discriminación entre los tratamientos se realizó mediante la ubicación de las muescas presentes en gráficos de caja y bigotes.

Se contaron los brotes por explante durante las cuatro primeras semanas de inducción y las cuatro semanas de multiplicación. Este conteo se realizó semanalmente. Del conteo total, se eliminaron aquellos explantes que presentaron contaminación, oxidación y nula respuesta. Los datos restantes fueron normalizados y fueron analizados bajo una previa transformación Box-Cox con la fórmula  $1 + \sqrt{y}$ . Posterior a la

---

transformación se realizó un análisis de varianza simple, para la validación de la misma y se realizó el contraste de varianza. Para la discriminación entre tratamientos se realizó el análisis de contraste múltiple LSD, con un 95% de confianza. Todos los análisis se efectuaron con el paquete estadístico StatGraphics Plus 5.1.

## 2.8 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

El análisis histológico se realizó en el tejido meristemático de los individuos que presentaron mayor producción de brotes. Éste análisis se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Piven *et al.* (2001) y modificado por Monja-Mio y Robert, (2013)

Los cortes obtenidos fueron teñidos con ácido periódico y reactivo Schiff por 30 min seguido del azul negro de naftol por 7 min. Una vez secos y teñidos los cortes, fueron observados utilizando microscopía óptica de campo claro en aumentos de 5x, 10x y 40x.

## 3. RESULTADOS.

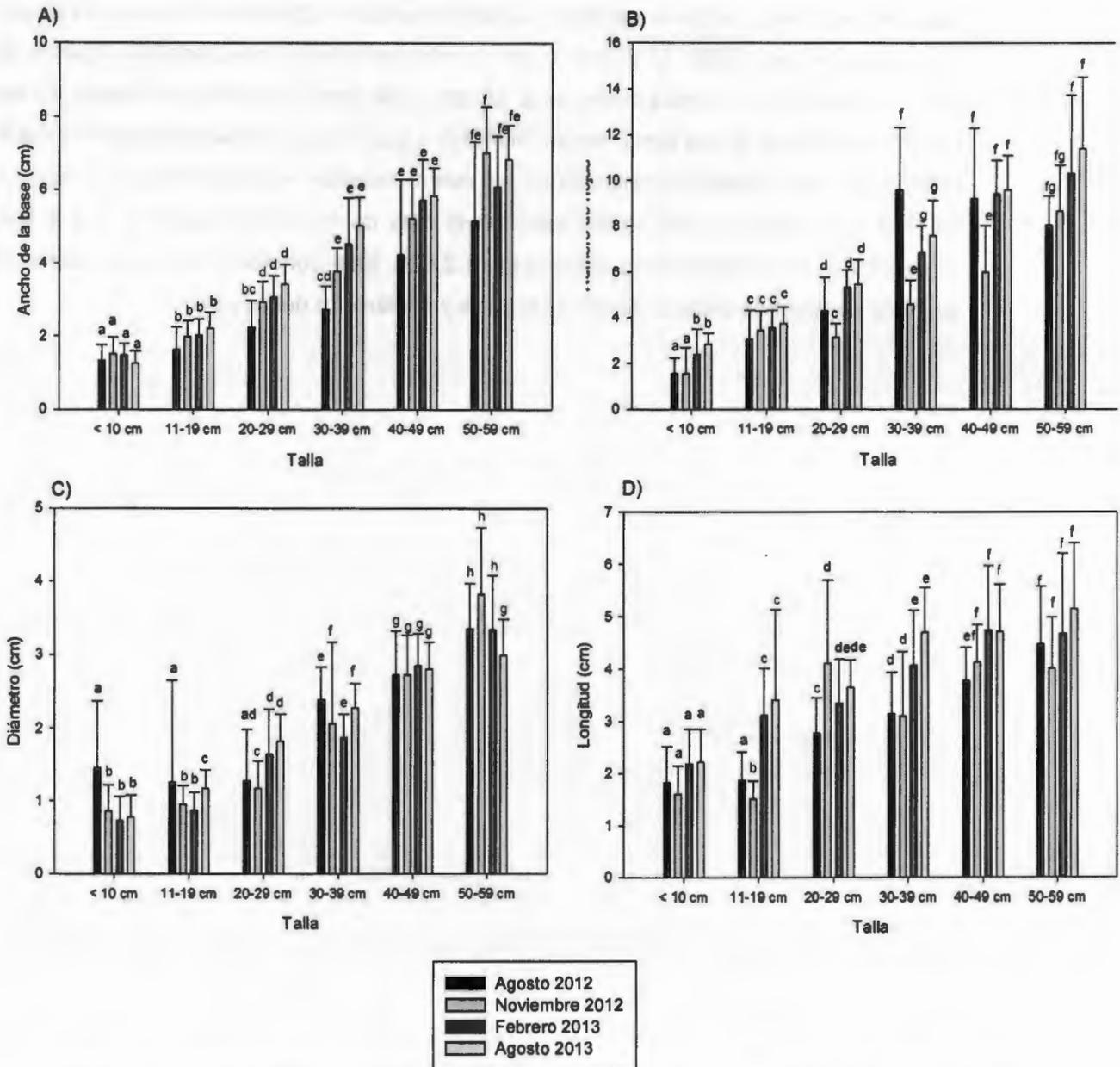
Los parámetros morfológicos analizados, presentaron diferentes comportamientos a lo largo del estudio realizado. El ancho de la base de los hijuelos, no mostró variación en tallas menores a los 20 cm. Sin embargo, en tallas mayores a 20 cm, la variación incrementa. Otros parámetros, como el promedio de hojas de los hijuelos, el diámetro y longitud del cogollo, varían sin presentar un patrón claro (Figura 2.5)

El número promedio de hojas de los hijuelos aumentó conforme aumentó la talla (Figura 2.5B), sin embargo, este promedio varía de acuerdo a la estación en la que se colectó el material. En el mes de agosto de 2012 el promedio del número de hojas es muy similar en los hijuelos de talla entre 30-39 y 40-49 cm, este promedio disminuyó en los hijuelos de 50-59 cm. Los hijuelos colectados el mes de agosto de 2012, presentaron tanto daños mecánicos como producidos por microorganismos, lo que provocó que los hijuelos tuvieran menor número de hojas sanas.

El ancho de la base de los hijuelos presento diferencias de acuerdo a las talla de los hijuelos, pero no hubo variación dentro de las tallas colectadas en diferentes épocas. (Figura 2.5A). El número de hojas de los hijuelos presento diferencias entre las diferentes

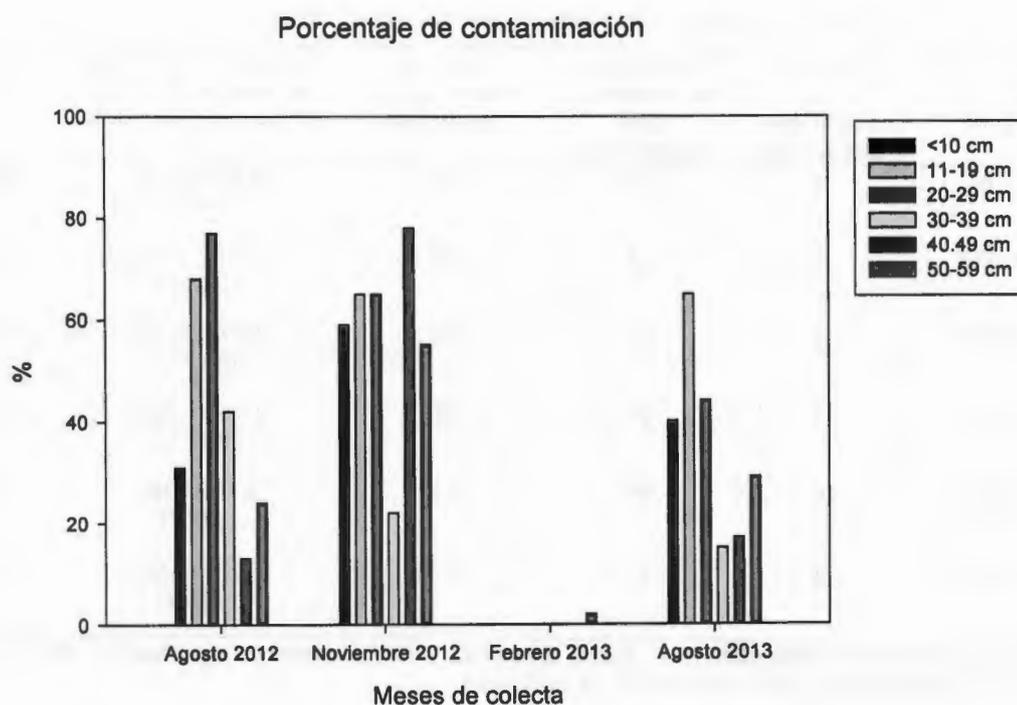
---

tallas, sin embargo, las tallas mayores a 30 cm presentaron diferencias de acuerdo al mes de colecta (Figura 2.5B). El diámetro del cogollo de hijuelos colectados en agosto de 2012, fue similar en plantas menores a 29 cm. Este comportamiento se repitió en los hijuelos colectados en los otros meses, menores a los 20 cm. La talla de 40.49 cm, fue el único grupo que presentó similitudes en las cuatro colectas realizadas (Figura 2.5C). La longitud del cogollo, la colecta realizada en el mes de noviembre de 2012, fue la que presentó mayor variación entre tallas (Figura 2.5D). Este comportamiento es notorio en los otros parámetros como el ancho de la base y el diámetro del cogollo.



**Figura 2.5.** Caracterización morfológica de los hijuelos de *Agave fourcroydes*. Se presentan los promedios de diferentes parámetros con Desviación Estándar de cada tratamiento. A) Promedio de ancho de la base de los hijuelos. B) Promedio de número de hojas de los hijuelos. C) Promedio del diámetro del cogollo. D) Promedio de la longitud del cogollo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

La contaminación fue distinta, tanto para cada grupo de talla como para cada mes de colecta. En la figura 2.6 se puede observar que el mes de febrero de 2013, fue el único que no presentó contaminación en ninguna de las tallas. Este mes corresponde a la época seca del periodo anual. Claramente existe una relación entre la época climática y la presencia de microorganismos en los materiales parentales. Es notorio que en el mes de agosto las tallas menores a los 29 cm presentaron mayor contaminación. Este mes correspondió a la época de lluvias, de la misma forma que el mes de agosto de 2012. Se observa que en ambos casos la contaminación prevaleció en tallas menores a los 29 cm.



**Figura 2.6.** Porcentajes de contaminación de explantes durante las primeras 8 semanas de cultivo.

La producción de brotes por explante según la talla de los hijuelos, fue analizada mediante la agrupación de los datos independientemente del mes de colecta. Se pudo observar que la producción varió de forma significativa de acuerdo a la talla. En la tabla 2.2 se muestra el porcentaje de explantes con respuesta morfogénica. La obtención en el número de explantes por planta varió dependiendo de la talla. En hijuelos menores a los

20 cm, solo fue posible obtener un explante por planta, en tanto que para las tallas mayores, el promedio de explantes por planta aumentó. La mayor producción de brotes se observó en plantas de talla de 20 a 29 cm, con un promedio de brotes por explante de 16.71 brotes.

En las tallas mayores a 30 cm, el total de explantes con respuesta fue similar, posiblemente debido a que la distribución del tejido meristemático se concentra en la parte superior central.

Tabla 2.2. Relación de la producción de brotes y la talla.

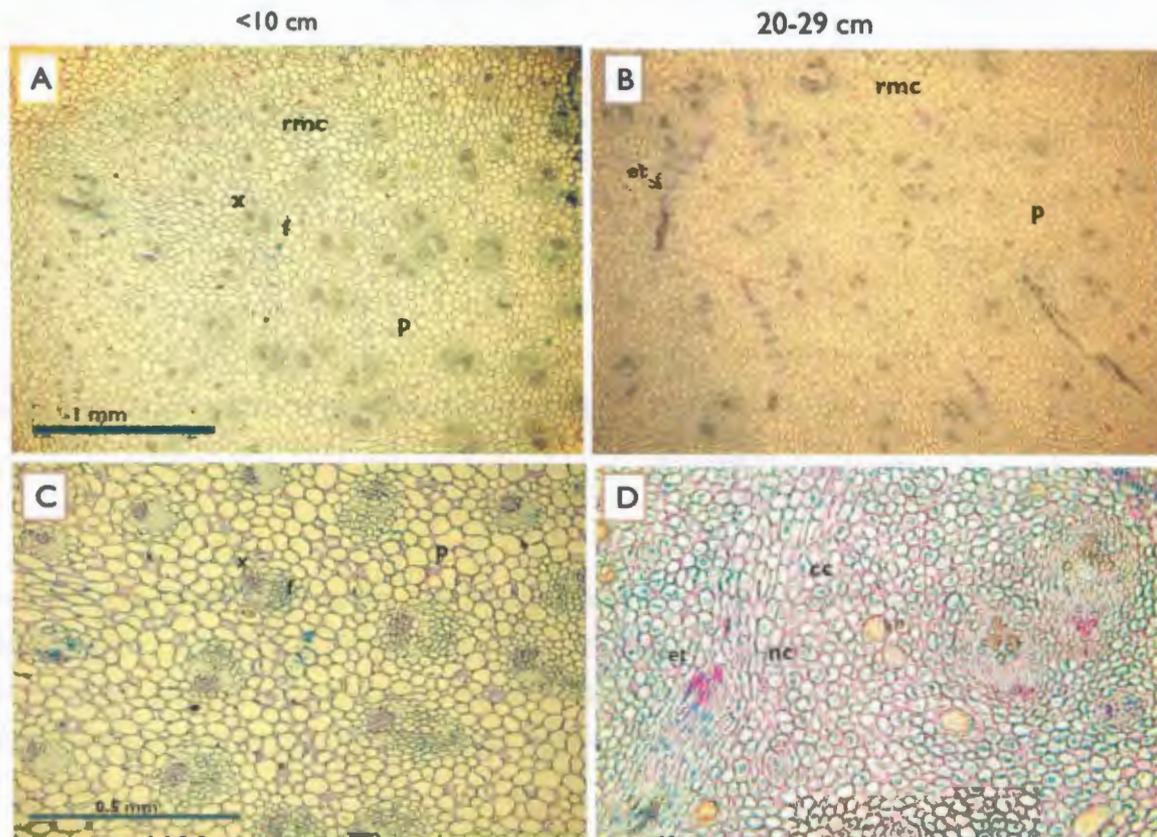
Altura de los hijuelos (cm)	Promedio de explantes por planta	Porcentajes de explantes con respuesta	Total de explantes con respuesta	Promedio de brotes por explante $\pm$ E.E. (dato transformado)	Total de brotes
>10	1	52	30	8.93 $\pm$ 1.41a (0.479)	268
11-19	1	42	19	9.74 $\pm$ 2.66 ab (0.497)	186
20-29	2	80	67	16.71 $\pm$ 2.93 <sup>a</sup> (0.483)	1120
30-39	4	65	158	6.16 $\pm$ 0.73bc (0.627)	974
40-49	6	46	156	5.15 $\pm$ 0.38c (0.657)	804
50-59	8	34	156	6.07 $\pm$ 0.45bc (0.602)	947

Letras diferentes representan que existe diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba LSD con un 95% de confianza.

Al analizar el estadio fisiológico del tejido meristemático por microscopía, se observaron elementos traqueidales (Figura 2.7). El tejido meristemático de plantas de 10 cm de altura, presentó mayor contenido de células del cambium, así como escasos elementos traqueidales (Figura 2.7B). Éstas células están relacionadas con las fibras, por lo que el contenido de estas células aumenta en tallas mayores o más desarrolladas.

Para el caso del grupo de plantas de 20-29 cm, se observó un mayor contenido de elementos traqueidales (Figura 2.7E). Los grupos de células del cambium son menos abundantes que el mismo grupo de células en las plantas de 10 cm. En general se

observaron células del xilema y floema, así como la región meristemática central concéntrica en la que el contenido de cambium vascular fue mayor.



**Figura 2.7** Corte transversal de la zona meristemática de plantas convencionales. A) Explante de planta de 10 cm de altura, a un acercamiento de 5x, parénquima (p), región meristemática central (rmc), células del xilema (x), células del floema (f). B) Explante de planta de 20-29 cm de altura, acercamiento de 5x, elementos traqueidales (et). C) Explante de planta de 10 cm, acercamiento 10x. D) Explante de planta de 20 a 29 cm de altura, acercamiento a 10x, elementos traqueidales (et), células del cambium vascular (cc) y núcleos centrales (nc).

También se observaron diferencias significativas en la producción de brotes en el mes de febrero de 2013 (Tabla 2.3), para este análisis, se reunieron todos los datos independientemente de la talla de la planta. En tanto que las plantas colectadas durante el mes de agosto de 2012, presentaron el promedio de brotes por explante menor de todos los grupos (3.71).

**Tabla 2.3.** Promedio de producción de brotes por explante de todas la tallas, en relación con el mes de colecta, relación con el promedio de brotes por explante.

Mes de colecta	Precipitación total del mes	Temperatura promedio del mes	Promedio de brotes por explante $\pm$ D.E. (dato transformado)
Agosto 2012	87.6	27.2	3.71 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup> (0.71)
Noviembre 2012	2.6	23.7	5.98 $\pm$ 0.85 <sup>ab</sup> (0.63)
Febrero 2013	1.4	24	14.29 $\pm$ 1.83 <sup>c</sup> (0.49)
Agosto 2013	45.4	26	6.53 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup> (0.58)

- Los datos de precipitación total y temperatura media mensual pertenecen a los reportes de la Estación Meteorológica del CINVESTAV, Telchac.
- Letras diferentes muestran diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba LSD con un 95% de confianza.

La producción de brotes de los hijuelos de talla menor a 10 cm (Tabla 2.4) fue mayor en los meses de febrero de 2013 (12.33) y agosto de 2013 (11.37). Los hijuelos de talla entre 11-19 cm presentaron mayor producción de brotes en la colecta del mes de agosto de 2013, por lo que solo las tallas menores tuvieron un buen rendimiento en época de lluvia.

Las plantas de talla entre 20-29 cm colectadas en febrero de 2013, presentaron el promedio de brotes por explante más alto de todos los tratamientos (44.05), incluso en hijuelos de la misma talla colectados en otros meses, debido a esto se puede concluir que existe un efecto de las condiciones de sequía en la producción de brotes.

Como se puede observar en la tabla 2.4, las plantas colectadas durante el mes de febrero de 2013, presentaron valores altos de producción de brotes en tallas menores a 39 cm, por lo que es claro que ambos factores, tanto ambientales como la edad fisiológica del tejido juegan un papel importante en la producción de brotes de la zona meristemática de los hijuelos.

Tabla 2.4. Producción de brotes de acuerdo con la talla de los hijuelos colectados en diferentes meses del año.

Talla de los hijuelos (cm)	Mes de colecta							
	Agosto de 2012		Noviembre de 2012		Febrero de 2013		Agosto 2013	
	Promedio de brotes/explant $\pm$ D.E	Total de brotes	Promedio de brotes/explante $\pm$ D.E.	Total de brotes	Promedio de brotes/explante $\pm$ D.E.	Total de brotes	Promedio de brotes/explante $\pm$ D.E.	Total de brotes
>10	3.67 $\pm$ 2.94 <sup>a</sup>	22	3.33 $\pm$ 3.21 <sup>b</sup>	10	12.33 $\pm$ 8.94 <sup>b</sup>	111	11.27 $\pm$ 7.36 <sup>a</sup>	124
11-10	2.00 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	6	9.00 $\pm$ 11.31 <sup>ab</sup>	18	5.50 $\pm$ 3.11 <sup>bcd</sup>	22	17.29 $\pm$ 15.73 <sup>a</sup>	121
20-29	1.67 $\pm$ 0.82 <sup>a</sup>	10	0.00	0	44.05 $\pm$ 26.36 <sup>a</sup>	925	4.65 $\pm$ 5.64 <sup>b</sup>	172
30-39	5.43 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>	163	3.36 $\pm$ 3.74 <sup>b</sup>	148	17.33 $\pm$ 18.45 <sup>b</sup>	364	4.80 $\pm$ 4.46 <sup>b</sup>	293
40-49	3.32 $\pm$ 4.27 <sup>a</sup>	166	1.00 $\pm$ 0 <sup>b</sup>	1	2.95 $\pm$ 2.98 <sup>d</sup>	65	7.20 $\pm$ 7.08 <sup>b</sup>	540
50-59	3.33 $\pm$ 3.07 <sup>a</sup>	120	10.88 $\pm$ 9.89 <sup>a</sup>	272	5.30 $\pm$ 4.45 <sup>c</sup>	228	6.48 $\pm$ 6.53 <sup>b</sup>	324

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas con la prueba LSD.

#### 4. DISCUSIÓN.

El material vegetal proveniente de campo presentó variaciones principalmente en el número de hojas sanas, diámetro y longitud del cogollo, esto se debe a que las plantas en cultivo tradicional se encuentran expuestas a ataques de depredadores, insectos, y enfermedades, aunado a los cambios ambientales, lo que implica que cada individuo se debe adaptar a dichas condiciones. Este tipo de efecto se pudo observar en las hojas de los hijuelos que en ocasiones presentaban daños como hojas, secas, maltratadas o muertas. Cabe mencionar que aunque en el proceso de colecta se buscan los materiales con las mejores condiciones, esto se dificulta conforme aumenta el rango de altura de los hijuelos, ya que al tener mayor tamaño, asumimos que tienen mayor edad y por lo tanto mayor exposición a los depredadores y cambios ambientales. George y Davies (2008) mencionan que la cantidad de tejido meristemático puede variar de acuerdo a la edad fisiológica de la planta madre, siendo menor en plantas adultas y mayor en plantas juveniles. Estos datos coinciden con lo observado en los cortes histológicos de plantas de 10 cm con mayor cantidad de células del cambium vascular entre los grupos vasculares, a diferencia de plantas 20-19 cm con mayor contenido de elementos traqueidales (Figura 2.7). Esto puede deberse a que el inicio de la actividad del cambium vascular está relacionado con las yemas jóvenes del tallo, debido a que en ellas se producen reguladores de crecimiento que inician la actividad del cambium (González-Embarcadero *et al.*, 2007). En el meristemo de plantas jóvenes se puede determinar una mayor cantidad de reguladores del crecimiento, lo que los hace más responsivos para la obtención de brotes, a diferencia del tejido de plantas de mayor tamaño, y por lo tanto de mayor edad.

En la tabla 2.4 se observan algunos promedios de brotes por explante mayores a los reportados para la especie, en primer lugar los hijuelos de 20 a 29 cm colectados en febrero de 2013 con 44.05 brotes por explante en promedio, fue el más alto. Este dato contrarrestado con el promedio de brotes por explante reportado por Robert *et al.*, (1987) que fue de 6 brotes por explante. Caraballo *et al.*,(2010), por su parte, reportan tres brotes por explante para material parental proveniente de plantas de 10 cm de altura. En cuanto a otras especies del género *Agave*, de las cuales se obtuvieron brotes a partir de la zona

meristemática de los hijuelos, se reporta 8.2 y 3.8 brotes por explante en *A. sisalana* (Nikam, 1997). Domínguez *et al.*, (2008) reporta, hasta once brotes por explante para *A. obscura* y Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, (1999), reportan 13.5 brotes por explante en *A. parrasana*. Este último reporte es el más cercano al promedio obtenido en el mejor tratamiento de este estudio (44 brotes por explantes de plantas de 20-29 cm colectadas en el mes de febrero).

En este trabajo reportamos una alta producción de brotes en los explantes colectados en el mes de febrero de 2013, una época caracterizada por la ausencia de lluvias, en tanto que los datos reportados por Robert *et al.*, (1992) para *A. tequilana*, fueron obtenidos de explantes colectados en la época de verano. Estos resultados podrían explicarse debido a que en las plantas de clima tropical la actividad del cambium vascular es relativamente constante, a diferencia de las plantas que crecen en climas de estacionalidad marcada, en los que la actividad del cambium cesa cuando las condiciones del medio son desfavorables (González-Embarcadero *et al.*, 2007).

Las plantas CAM, como los agaves, presentan un alto grado de plasticidad fisiológica, por lo tanto, estos cambios estimulan las respuestas fisiológicas en las plantas y sus órganos a corto plazo, y cambios estructurales a mediano y largo plazo (Dodd *et al.*, 2002). Es posible que este estadio fisiológico permita una rápida y abundante respuesta organogénica.

Luján *et al.*, (2009), han reportado que la tolerancia a la sequía en plantas de *A. tequilana* está dada por una acumulación de proteínas de choque térmico (HSP), tanto en el ápice de las hojas como en la base de éstas. Ello supone que en *A. fourcroydes* el mecanismo de protección a cambios de temperatura puede ser similar, lo que otorga a la planta tolerancia a altas temperaturas, frecuentes en épocas de sequía, provocando que no se pierda la capacidad responsiva de las células meristemáticas.

El aumento observado en la producción de brotes de hijuelos colectados el mes de agosto de 2012, puede deberse a las condiciones de inducción, en las cuales se presentaron la mayoría de eventos de contaminación y oxidación, sumados a la mano de obra inexperta, lo que propició el crecimiento de hojas preexistentes en la zona

meristemática de los explantes. Esto impide la formación de brotes *de novo*, lo que subraya la importancia de realizar el corte y localización de la zona meristemática con precisión. Como se puede observar en la figura 2.6, es partir de los hijuelos que fueron colectados los meses de noviembre de 2012, y febrero y agosto de 2013, en los que se obtuvo la mayor producción de brotes.

En estudios realizados en *A. tequilana* se observó que la capacidad fotosintética, en épocas de escasez hídrica, se mantiene constante, gracias a que se presentan la característica de secuestrar carbono aún en periodos largos de sequía. Esta característica está presente en mayor proporción en plantas de 1 a 3 años, que en plantas mayores a 4 años (Borland *et al.*, 2011; Pimienta-Barrios *et al.*, 2001, 2006). Se ha reportado que los productos de la fotosíntesis en el henequén son producidos en las hojas y posteriormente almacenados como carbohidratos no estructurales en la piña de la planta. Esta producción puede verse afectada por los cambios ambientales estacionales (Pimienta-Barrios *et al.*, 2001, 2006). *A. tequilana* reduce la asimilación neta de CO<sub>2</sub> a altas temperaturas (>55°C) debido a que estimulan la respiración, mientras que las bajas temperaturas (<6°C) causan daño al tejido fotosintético. Las temperaturas promedio día/noche (25/8°C) aumentan la ganancia de carbono (Pimienta-Barrios *et al.*, 2001, 2006), por lo que los cambios ambientales causados por efectos estacionales impactan en el comportamiento fisiológico de las plantas.

---

## 5. CONCLUSIÓN

El material parental proveniente de cultivos en campo presenta variabilidad fenológica en cuanto al número de hojas de las plantas, diámetro y longitud del cogollo. Esta variación tiene un efecto en la producción de brotes de la zona meristemática, que está posiblemente relacionada con el genotipo, lo que puede ser una desventaja para la propagación masiva de los cultivos tradicionales.

Los hijuelos de talla entre 20 y 29 cm producen un mayor número de brotes que los hijuelos de menor o mayor talla. El promedio de brotes es mayor cuando los hijuelos fueron colectados en el mes de febrero.

Los factores ambientales juegan un papel importante en la respuesta morfogénica de los tejidos vegetales. Sin embargo, ésta depende también de la edad fisiológica, la resistencia a situaciones de estrés, la especie y el genotipo.

---

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Borland, A.M., V.A. Barrera Zambrano, J. Ceusters, K. Shorrocks (2011). The photosynthetic plasticity of crassulacean acid metabolism: an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changing world. *New Phytol.* 191, 619–33.
- Cassells, A.C. (2005). Principles of Micropropagation, in: Munich, S., Sakena, P. (Eds.), *Journey of a Single Cell to a Plant*. Science Publishers, pp. 287–308.
- Dodd, A.N., A.M. Borland, R.P. Haslam, H. Griffiths, K. Maxwell (2002). Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic. *J. Exp. Bot.* 53, 569–80.
- Domínguez, M., A. Alpuche, N. Vasco, E. Perez-Molphe (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Fitotecnia de México*. 31, 317–322.
- George, E.F., W. Davies (2008). Effects of the Physical Environment, in: George, E., Hall, M., Klerk, F. De (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht, Netherlands, pp. 423–464.
- González-Embarcadero, A., E. Cedillo-Portugal, L. Díaz-Garduño (2007). *Morfología y anatomía de las plantas con flores*, Primera. ed. Universidad Autónoma Chapingo, México, Texcoco.
- Luján, R., F. Lledías, L.M. Martínez, R. Barreto, G.I. Cassab, J. Nieto-Sotelo (2009). Small heat-shock proteins and leaf cooling capacity account for the unusual heat tolerance of the central spike leaves in *Agave tequilana* var. Weber. *Plant. Cell Environ.* 32, 1791–803.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- Nikam, T.D. (1997). High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 51, 225–228.

- Nobel, P.S. (1990). Environmental Influences on CO<sub>2</sub> Uptake by Agaves , CAM Plants with High Productivities 1. *Economy Botany*. 44, 488–502.
- Pimienta-Barrios, E., C. Robles-Murguía, P.S. Nobel (2001). Net CO<sub>2</sub> Uptake for *Agave tequilana* in a Warm and a Temperate Environment. *Biotropica* 33, 312–318.
- Pimienta-Barrios, E., J. Zañudo-Hernández, J. García-Galindo (2006). Seasonal Photosynthesis in Young Plants of *Agave tequilana*. *Agrociencia* 40, 699–709.
- Robert, M., J. Herrera, J. Chan, F. Contreras (1992). Micropropagation of *Agave* spp. *Biotechnol. Agric. For.* 19, 306–329.
- Robert, M., J. Herrera, F. Contreras y K. Scorer (1987). *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 8, 37–48.
- Robert, M.L., J.L. Herrera-Herrera, E. Castillo, G. Ojeda, M.A. Herrera-Alamillo (2006). An efficient method for the micropropagation of *Agave* species. *Methods Mol. Biol.* 318, 165–178.
- Robert, M.L., J.L. Herrera-Herrera, M.A. Herrera-Alamillo, A. Quijano-Ramayo, U.E. Balám (2004). Manual for the *in vitro* culture of Agaves (No. 38). Vienna.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., H. Gutiérrez-Pulido, B. Rodríguez-Garay (1999). Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 56, 163–167.

### PÁGINAS WEB:

Estación meteorológica del CINVESTAV, Telchac, 2014. Telchac puerto. [Online].  
Disponible en: [http://www.mda.cinvestav.mx/weather2/Current\\_Vantage\\_Pro.htm](http://www.mda.cinvestav.mx/weather2/Current_Vantage_Pro.htm)

[Acceso en Mayo de 2012]

## CAPÍTULO III

### **EMPLEO DE PLANTAS MICROPROPAGADAS COMO MATERIAL PARENTAL PARA LA OBTENCIÓN DE BROTES ADVENTICIOS EN *Agave fourcroydes* Lem.**

#### **1. INTRODUCCIÓN**

El mejoramiento por selección clonal es un medio eficaz para el mantenimiento e incremento de la productividad y el control de enfermedades (Robert *et al.*, 2004). Por ello, la selección de los individuos con características deseables, escalado al proceso de micropropagación, es una herramienta eficaz para la obtención de altas tasas de productividad de los individuos seleccionados, y no cabe duda que es una alternativa biotecnológica eficiente. Sin embargo, los costos de las plantas micropropagadas sigue excediendo el costo de las plantas propagadas por métodos convencionales (Bhojwani y Dantu, 2013).

Los altos costos de productividad de la micropropagación deben tener en cuenta el perfeccionamiento de protocolos y la capacitación de empleados, así como las pérdidas por contaminación de los sistemas de cultivo, además del periodo de transferencia *ex vitro* para aclimatarse a las condiciones autótrofas (Pospisilova *et al.*, 2007). Para mitigar los altos costos, la micropropagación comercial se ha basado en la obtención de mayor brotación axilar, la superación de la dominancia apical natural con citocininas y otros factores para estimular la formación de yemas laterales. Sin embargo, estas estrategias aún no han contribuido significativamente a reducir el costo del producto final ya que esto ha aumentado la mano de obra y disminuido la calidad de las plántulas (Sluis, 2008).

Se ha reportado que las plántulas aclimatadas presentan características fenotípicas similares a las plantas en fase juvenil, tales como el tamaño de las hojas y la mayor capacidad de producción de raíces, lo que algunos autores han considerado como rejuvenecimiento (Cassells, 2005; Preece, 2008). Hasta el momento, las características obtenidas de las plantas micropropagadas se han aprovechado sólo en el desarrollo de las plantas en campo, por lo que el potencial de las plantas producidas por micropropagación no ha sido explotado como material parental ya seleccionado. Sin

embargo, se cuenta con un antecedente realizado en 2011, en el cual el equipo de trabajo del Dr. Manuel L. Robert empleó la zona meristemática de plantas cultivadas *in vitro*, y posteriormente aclimatadas en condiciones de campo, como material parental para la propagación de *A. tequilana*, y obtuvo 24 brotes por explante a las cuatro semanas de cultivo en comparación con el material proveniente de cultivo convencional por rizoma en los que se obtienen cuatro brotes por explante a la cuarta semana de cultivo. En este trabajo se utilizaron plantas micropropagadas de henequén como material parental para tratar de mejorar la producción de brotes por explantel.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

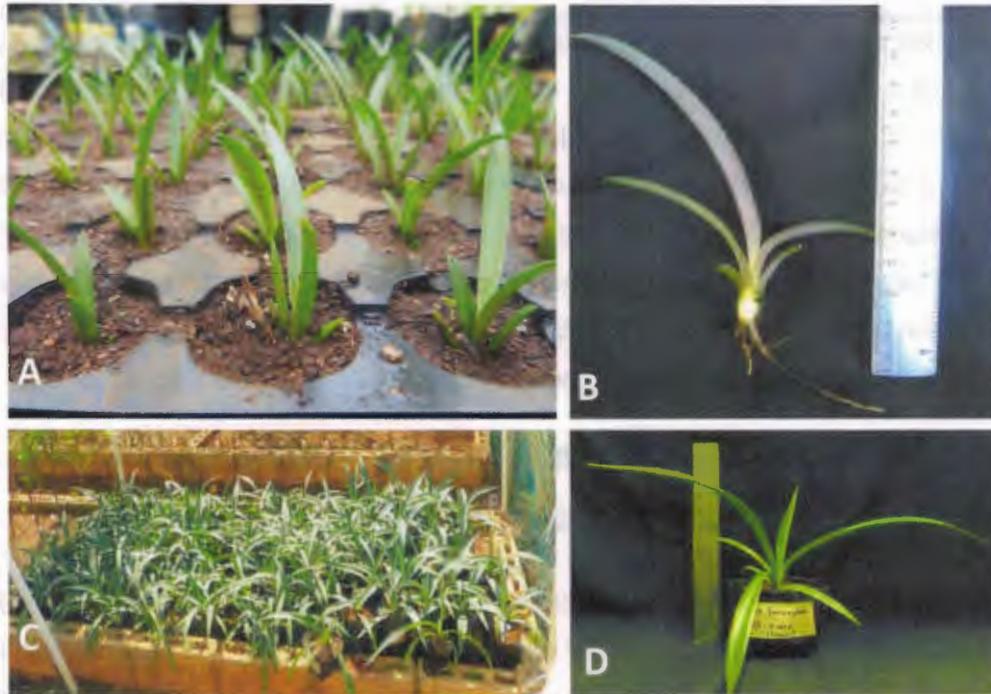
### **2.1 PLANTAS ACLIMATADAS EN INVERNADERO**

Para este estudio se utilizaron 120 plantas de *A. fourcroydes* provenientes de la clona K33 propagadas tanto por OD como por ES. Todas las plantas fueron donadas por la Dra. Kelly Monja-Mio. Las condiciones de aclimatación fueron las reportadas por Monja-Mio (2013).

Las vitroplantas presentaron en promedio una talla de 8 cm al ser transferidas a condiciones de invernadero (Figura 3.1A), éstas fueron puestas en charolas de germinación con un sustrato compuesto de Sunshine: tierra 1:1. Después del primer mes de aclimatación, las plantas fueron transferidas a bolsas de 1 kg con sustrato compuesto por Sunshine y tierra, 3:1 en condiciones de invernadero (Figura 3.1B). Las plantas permanecieron en dichas condiciones por ocho meses. Durante este tiempo las plantas presentaron una altura promedio de 15 a 20 cm y 5 hojas en promedio

### **2.2 PLANTAS ACLIMATADAS EN VIVERO**

Una vez que las plantas cumplieron nueve meses en condiciones de invernadero, se transfirieron a condiciones de vivero, 60 plantas provenientes de OD y 40 provenientes de ES, a bolsas de 3 kg de capacidad, con sustrato compuesto por Sunshine y tierra 3:1. Estas plantas fueron colocadas en un vivero con malla sombra del 35% por tres meses. Después de este tiempo, se retiró la malla sombra y las plantas permanecieron a la intemperie por seis meses más (Figura 3.1C y D). El resto de las plantas permanecieron en invernadero.



**Figura 3.1** Lugar de aclimatación de plantas propagadas *in vitro*. A) Plantas en invernadero con un mes de aclimatación en charolas de germinación. B) Planta en transferencia de charola a bolsa, en condiciones de invernadero. C) Plantas en el vivero después de tres meses. D) Planta con tres meses de aclimatación en vivero.

### 2.3 OBTENCIÓN DE LA ZONA MERISTEMÁTICA E INDUCCIÓN DE BROTES.

Las plantas fueron clasificadas en cinco tallas distintas (15-20 cm, 25-30 cm, 30-35 cm, 35-40 cm y 45-50 cm), colectadas del invernadero y del vivero. Posteriormente se realizó la extracción de la zona meristemática de la misma manera que se describió en el capítulo anterior (sección 2.3). Una vez obtenidos los cogollos de las plantas, éstos fueron sumergidos en una solución desinfectante compuesta de 2% de hipoclorito de sodio (cloro comercial), 2% de Extran® (detergente) y 2 gotas de Tween 80® por cada litro de solución. Se talló el cogollo cuidadosamente en su totalidad y fue enjuagado con agua destilada. Posteriormente, los cogollos fueron sumergidos por 15 minutos en la solución desinfectante preparada al instante. Los cogollos fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril. Dentro de la campana de flujo laminar, los cogollos se sumergieron en hipoclorito de sodio al 40% (v/v), durante 15 min, posteriormente fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril.

Posteriormente se realizó el corte de la zona meristemática y la obtención de los explantes. Éstos fueron cultivados en el medio de cultivo MS-B (Anexo 1), adicionado con 0.112  $\mu\text{M}$  de 2,4-D, 44 $\mu\text{M}$  de BA y 1.1 % de agar, pH 5.75, y, cultivados en luz continua a una intensidad luminosa de 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$  a  $25 \pm 2$  °C, durante cuatro semanas. Los brotes obtenidos en la fase de inducción, fueron colocados en medio MSB, adicionado con 0.112  $\mu\text{M}$  de 2,4-D y 44  $\mu\text{M}$  de BA, 0.3% de agar y 0.3 % de Gelrite, cultivados por cuatro semanas en condiciones de fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad, bajo una intensidad luminosa de 45  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$  a  $25 \pm 2$  °C

Los brotes se contaron de forma semanal durante las primeras ocho semanas de cultivo. Los datos se analizaron como se indica en el capítulo II, sección 2.5. De forma adicional, se realizó el análisis histológico del tejido meristemático de los individuos que presentaron mayor producción de brotes. El procedimiento histológico que se realizó fue el mismo reportado por Piven *et al.*, (2001) y modificado por Monja-Mio (2013) (Anexo 2).

## 2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de la caracterización morfológica de las plantas provinieron de las 20 plantas colectadas por cada mes tanto de OD como de ES y tanto cultivadas en invernadero como en vivero. Estos datos fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis. La discriminación entre los tratamientos se realizó mediante la ubicación de las muescas presentes en gráficos de caja y bigotes.

Se contaron los brotes por explante durante las cuatro primeras semanas de inducción y las cuatro semanas de multiplicación. Este conteo se realizó semanalmente. Del conteo total, se eliminaron aquellos explantes que presentaron contaminación, oxidación y nula respuesta. Los datos restantes fueron normalizados y analizados bajo una previa transformación Box-Cox con la fórmula  $1 + \sqrt{y}$ . Posterior a la transformación se realizó un análisis de varianza simple. Para la validación de la misma se realizó el contraste de varianza. Para la discriminación entre tratamientos se realizó el análisis de contraste múltiple LSD, con un 95% de confianza. Todos los análisis se efectuaron con el paquete estadístico StatGraphics Plus 5.1.

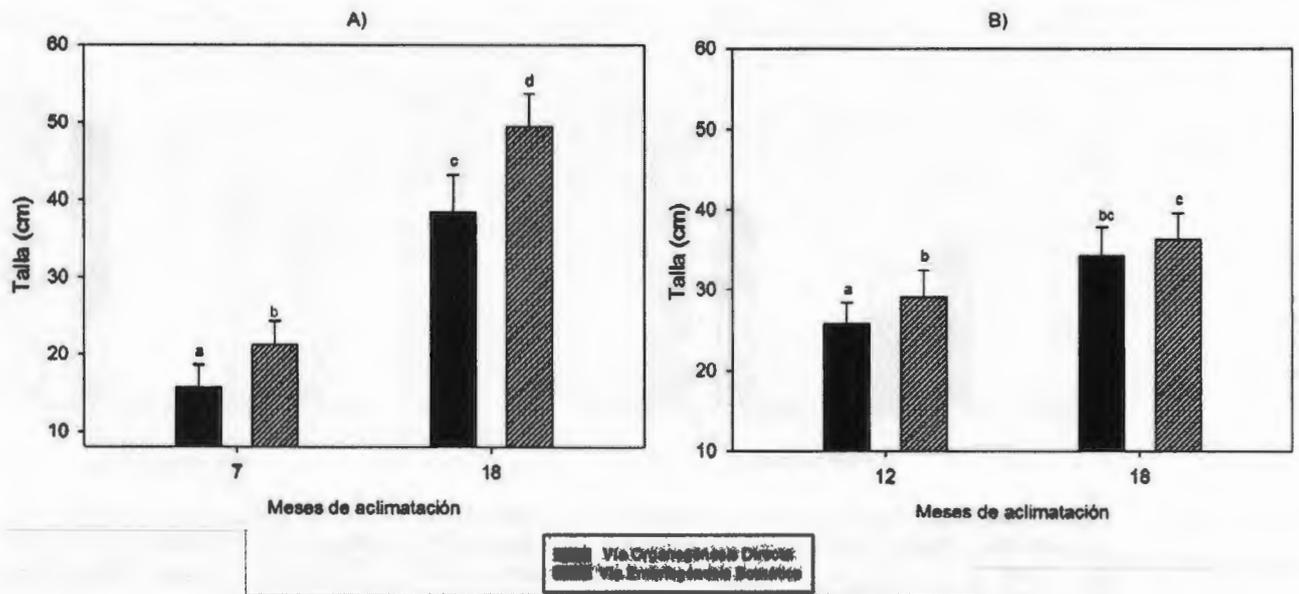
### 3. RESULTADOS

Las plantas aclimatadas presentaron un 98% de sobrevivencia al final del primer mes de aclimatación; este porcentaje se mantuvo constante en los siguientes tres meses. No se observaron diferencias en la talla promedio de las plantas aclimatadas en invernadero entre los 3 y 6 meses de edad. Después de siete meses de aclimatación en el invernadero, las plantas propagadas vía ES, presentaron un crecimiento promedio de 2 a 3 cm por mes. Este comportamiento también se en las plantas propagadas por OD a partir de los ocho meses de aclimatación (Figura 3.2A).

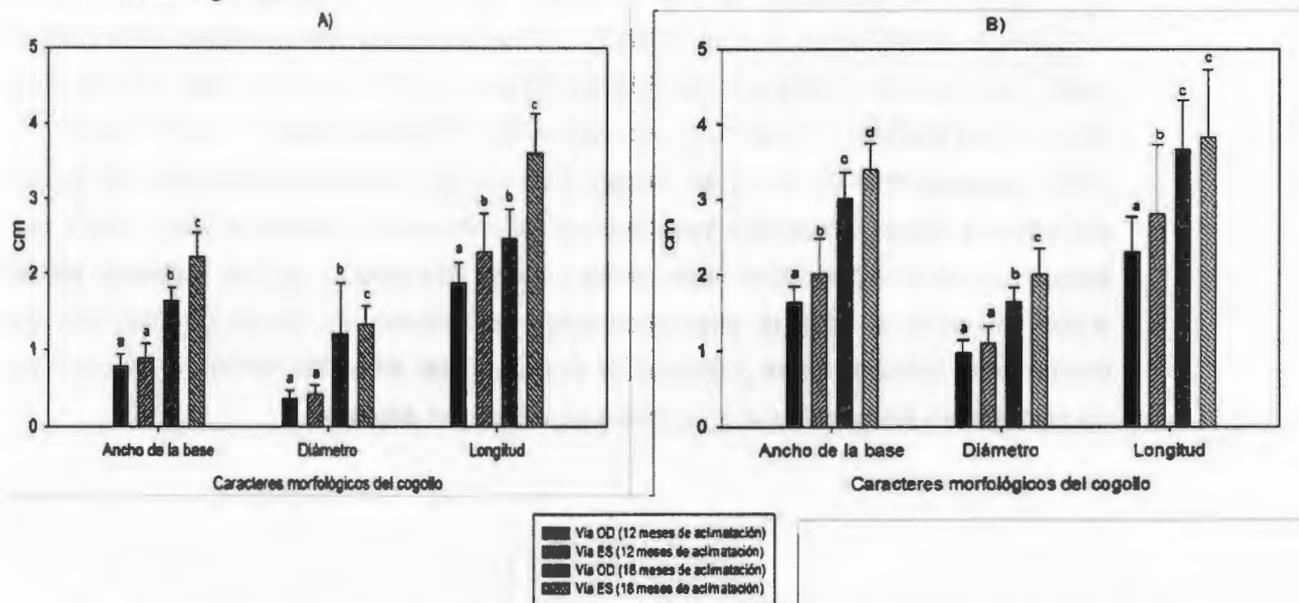
El crecimiento *ex vitro* que presentaron las plantas propagadas por ES fue mayor que el crecimiento observado en plantas propagadas por OD. Este comportamiento se observó tanto en plantas aclimatadas en invernadero, como en plantas aclimatadas en vivero, en tanto que el crecimiento de plantas propagadas por ES fue mayor en invernadero que en vivero (Figura 3.2B). El ancho de la base, diámetro y longitud del cogollo de plantas aclimatadas en invernadero fue mayor en plantas propagadas por ES, sin embargo, la diferencia es más notoria en la longitud del cogollo tanto para plantas con siete meses de aclimatación, como para plantas con 18 meses (Figura 3.3A).

Los cogollos de las plantas aclimatadas en vivero por 18 meses, presentaron mayor vigor y grosor que las plantas aclimatadas en invernadero (Figura 3.3B) Estos datos son contrastantes con lo observado en la talla promedio de las planta, esto indica que en condiciones de vivero, las plantas no incrementan su talla al igual que en condiciones de invernadero, sin embargo, esto se ve compensado con el engrosamiento de la base. Este efecto se puede observar de igual manera, en el promedio de hojas (Figura 3.4). Las plantas de 18 meses de aclimatación aclimatadas en vivero presentan mayor producción de hojas que las aclimatadas en invernadero.

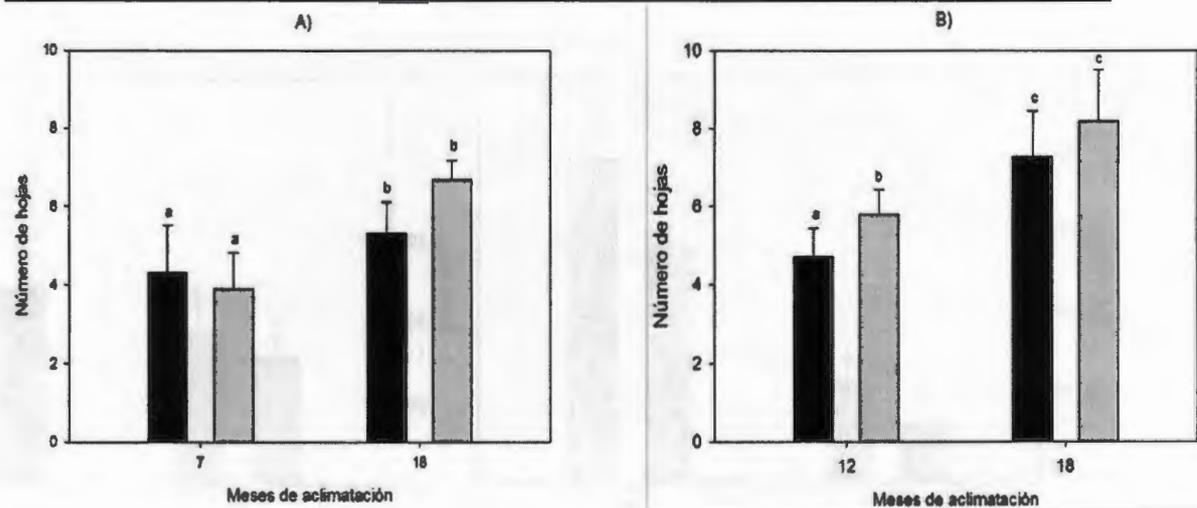
El promedio del número de hojas presentó el mismo patrón que el del crecimiento, tanto del cogollo, como el de las plantas. Las plantas propagadas por ES produjeron mayor número de hojas que las plantas propagadas por OD (Figura 3.4).



**Figura 3.2.** Promedio y desviación estándar de talla observada en plantas acimatadas cultivadas *in vitro*. A) Plantas acimatadas en invernadero a los 7 y 18 meses de acimatación. B) Plantas acimatadas en vivero a los 12 y 18 meses de acimatación. Letras diferentes indican diferencias significativas.



**Figura 3.3** Promedio y desviación estándar del ancho de la base, diámetro y longitud del cogollo de plantas acimatadas cultivadas *in vitro* vía OD y ES. A) Plantas acimatadas en invernadero a los 7 y 18 meses de acimatación. B) Plantas acimatadas en vivero a los 12 y 18 meses de acimatación. Letras diferentes indican diferencias significativas.



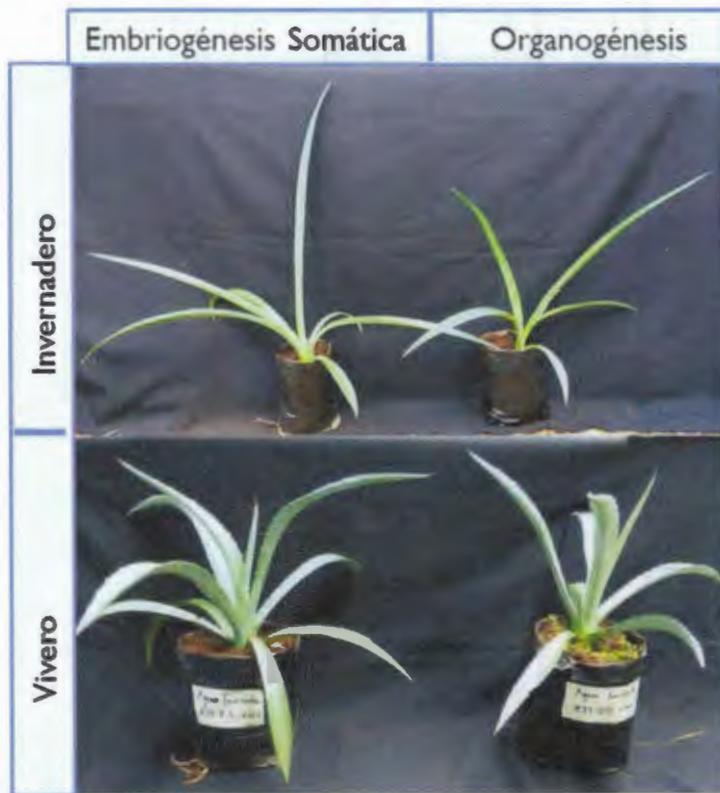
**Figura 3.4** Promedio y desviación estándar del número de hojas de plantas aclimatadas. A) plantas aclimatadas en invernadero a los 7 y 18 meses de aclimatación. B) Plantas aclimatadas en vivero a los 12 y 18 meses de aclimatación. Letras diferentes indican diferencias significativas.,

La producción de brotes a lo largo de ocho semanas de cultivo presentó algunas diferencias tanto en la vía de propagación como en el lugar de aclimatación. Al observar la producción de brotes por explante de acuerdo a la vía de propagación independiente del lugar de aclimatación, la producción de brotes de las plantas propagadas por ES fue mayor que las propagadas por OD (Tabla 3.1) presentando diferencia significativa. Por otro lado, al analizar la producción de brotes de acuerdo al lugar de aclimatación de forma independiente de la vía de propagación, aquellas plantas propagadas en vivero presentaron mayor producción que aquellas aclimatadas en invernadero con diferencia estadísticamente significativa. Esto puede estar relacionado con el aumento en el ancho, diámetro y longitud que presentaron las plantas de vivero (Figura 3.5). Al contrarrestar tanto la vía de propagación como el lugar de aclimatación, no se observa un patrón claro en cuanto a la producción de brotes por explante.

**Tabla 3.1.** Producción de brotes por explante de acuerdo al lugar de aclimatación y vía de propagación.

Vía de propagación	Lugar de aclimatación						Promedio total de brotes por explante $\pm$ EE
	Invernadero			Vivero			
	Promedio de brotes por explante $\pm$ E.E.	Total de explante con respuesta	Total de brotes producidos	Promedio de brotes por explante $\pm$ E.E.	Total de explante con respuesta	Total de brotes producidos	
<b>Organogénesis directa</b>	8.11 $\pm$ 1.07 <sup>c</sup> 0.53	80	649	12.75 $\pm$ 1.44 <sup>a</sup> 0.39	40	509	9.65 $\pm$ 0.88 <sup>abc</sup> 0.48
<b>Embriogénesis somática</b>	12.23 $\pm$ 1.99 <sup>ab</sup> 0.40	26	318	10.24 $\pm$ 1.88 <sup>abc</sup> 0.45	37	379	11.06 $\pm$ 1.37 <sup>ab</sup> 0.43
<b>Promedio total de brotes por explante <math>\pm</math> EE</b>	9.12 $\pm$ 0.95 <sup>bc</sup> 0.50			11.53 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup> 0.42			

Letras diferentes indican diferencias significativas en la discriminación de tratamientos con el análisis LDS.



**Figura 3.5.** Plantas de origen micropropagado provenientes de la clona K33 con 16 meses de aclimatación. La aclimatación se dio de dos formas: la fila "invernadero", indica que éstas permanecieron 16 meses en condiciones de invernadero. La fila "vivero" indica que luego de nueve meses en invernadero fueron transferidas a condiciones de vivero por siete meses. Las columnas "embriogénesis somática" y "organogénesis" señalan la vía de micropropagación por las que se obtuvieron los individuos.

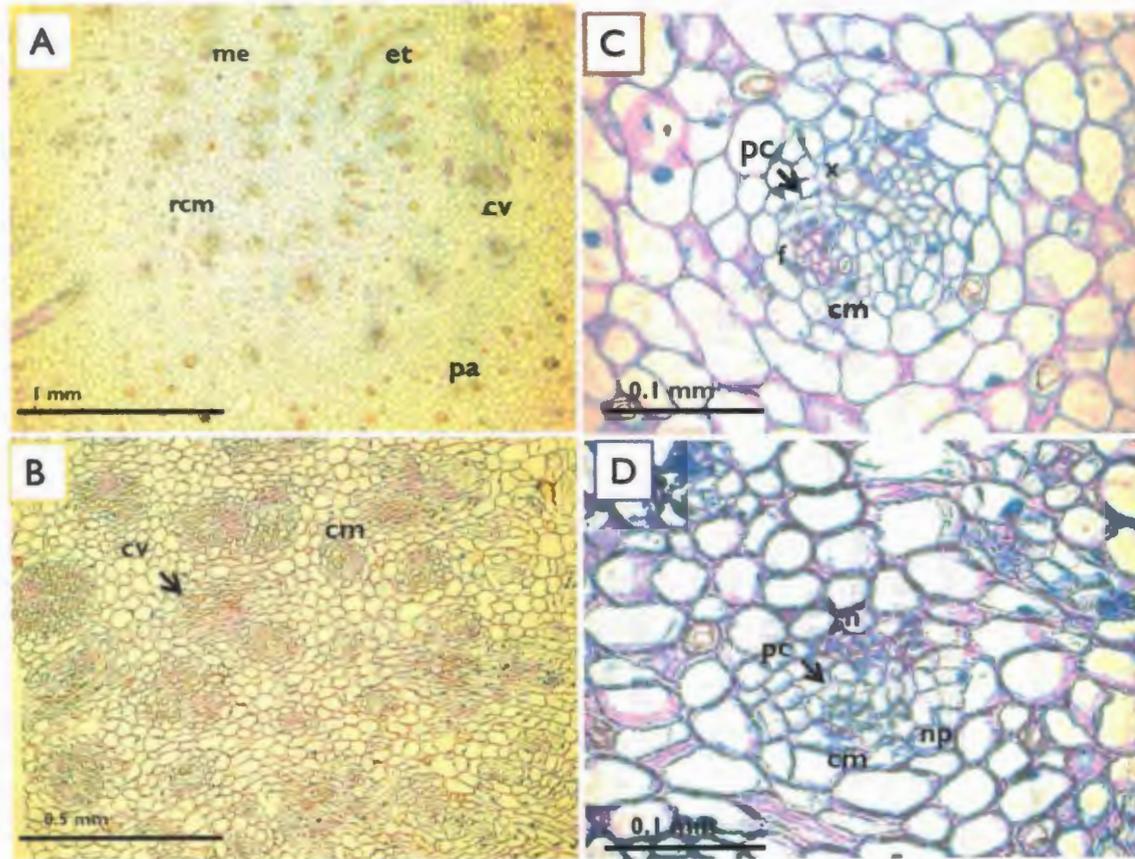
La producción de brotes de acuerdo a la talla de las plantas fue mayor en plantas mayores a 20 cm. En la Tabla 3.2 se observa que se obtuvo una mayor producción de brotes por explante en la talla de 35-40 cm aclimatadas en invernadero (26.67 brotes por explante). De las plantas aclimatadas en vivero, aquellas con una talla entre 25-30 cm presentaron el promedio más elevado. Lo anterior sugiere que la talla y el tipo de aclimatación tiene efecto en la capacidad regenerativa.

**Tabla 3.2.** Producción de brotes de acuerdo con el lugar de aclimatación, origen de propagación *in vitro* y talla promedio de las plantas.

Lugar de aclimatación	Talla de la planta (cm)	Promedio de brotes por explant $\pm$ EE Dato transformado	Total de explantes con respuesta/total de explantes	Total de brotes
<b>Invernadero</b>	<b>15-20</b>	<b>7.42<math>\pm</math>0.89<sup>a</sup></b> 2.42	<b>61/95</b>	<b>379</b>
	<b>30-35</b>	<b>9.61<math>\pm</math>2.51<sup>abc</sup></b> 2.72	<b>18/20</b>	<b>173</b>
	<b>35-40</b>	<b>26.67<math>\pm</math>6.46<sup>d</sup></b> 4.81	<b>6/10</b>	<b>160</b>
	<b>45-50</b>	<b>13.75<math>\pm</math>2.75<sup>abcd</sup></b> 3.65	<b>4/10</b>	<b>55</b>
<b>Vivero</b>	<b>25-30</b>	<b>15.58<math>\pm</math>2.62<sup>cd</sup></b> 3.64	<b>17/20</b>	<b>258</b>
	<b>30-35</b>	<b>9.33<math>\pm</math>1.31<sup>ab</sup></b> 2.77	<b>30/40</b>	<b>280</b>
	<b>35-40</b>	<b>11.67<math>\pm</math>2.23<sup>bc</sup></b> 3.05	<b>30/40</b>	<b>350</b>

Letras diferentes indican diferencias significativas.

El análisis histológico mostró una cantidad similar de células del cambium tanto en plantas de talla de 15-20 como en las de 25-30 cm. Se observaron escasos elementos traqueidales, así como células del parénquima que rodean a los haces vasculares (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Cortes transversales de la zona meristemática de la clona K33 utilizada como material parental. A) Observación (5 x) de la región central meristemática (rcm), células del cambium (cc), elementos traqueidales (et). B) Detalle de células del xilema (x) y floema (f) y células a 10 x C) Detalle de las cc. 40 x D) Se observan núcleos centrales (n) y núcleos periféricos (np), así como células del parénquima (p) a 40x.

#### 4. DISCUSIÓN

El porcentaje de sobrevivencia de las plántulas aclimatadas fue mayor a lo reportado previamente por Robert, *et al.*, (1992), por lo que el proceso de aclimatación se consideró exitoso. Sin embargo, el poco crecimiento que se observó en el periodo de tres a nueve meses, en condiciones de invernadero, no coincide con lo reportado por

---

Abreu *et al.*, (2007), el cual realizó la aclimatación y enraizamiento *ex vitro* de plantas de *A. fourcroydes* y observó un cambio diferencial en la altura de las plantas y en la producción de nuevas hojas después de 30 días en invernadero.

Las plantas propagadas por ES presentaron mayor altura, tanto en plantas cultivadas es condiciones de vivero como de invernadero. Esta observación es similar a lo reportado previamente por Monja-Mio y Robert, (2013).

La formación de los brotes en los explantes, se observó a partir de las segunda semana de cultivo, esta velocidad de respuesta es similar a la observada en los antecedentes del equipo de trabajo del Dr. Manuel L. Robert en *A. tequilana* en 2011 (Comunicación Personal). Sin embargo, esta observación es diferente observado en plantas provenientes de campo, en los cuáles la formación de brotes se observa a partir de la cuarta y quinta semana de cultivo (Robert *et al.*, 1987).

En este estudio se observó que las plantas aclimatadas en invernadero, con una talla de 35-40 cm, presentaron un promedio de brotes por explante similar a lo observado por el equipo de trabajo del Dr. Manuel L. Robert en *A. tequilana* (26 brotes por explante). Cabe destacar, que la talla de las plantas de *A. tequilana*, fue de 35 cm. En ambos trabajos, el promedio obtenido proviene de plantas propagadas vía OD.

Los tres factores estudiados en este trabajo (talla de la planta, vía de propagación y lugar de aclimatación), tienen un efecto en la producción de brotes, siendo la talla de la planta, el factor con mayor influencia. Esto puede deberse a que las plantas de mayor talla, presentan mayor cantidad de tejido. Ello indica que la sobreproducción de brotes no está relacionada con la vía de propagación y lugar de aclimatación, sino con la naturaleza del material parental proveniente de la micropropagación.

En plantas propagadas convencionalmente, el promedio más alto de brotes por explante se observó en plantas de talla entre 20-29 cm de altura (Capítulo II), las cuales tienen un elevado contenido de células meristemáticas en el tejido central del cogollo. Para las plantas obtenidas por micropropagación, el promedio de brotes por explante más alto se observó en aquellas plantas con talla de 30-35 cm. Es posible que en plantas micropropagadas, el contenido de células del cambium sea mayor, aun

considerando plantas de mayor talla. Debido a esto, el origen del material parental, tiene un efecto determinante en la producción de brotes, seguido por la talla de la planta y las condiciones ambientales a los que se somete la planta madre.

El material parental de plantas micropropagadas produjo un promedio de brotes por explante mayor que el material convencional, así como también un mayor porcentaje de respuesta (Tabla 3.3). Esto puede deberse a que las características entre ambos materiales son contrastantes, principalmente en la cantidad de tejido meristemático.

**Tabla 3.3** Producción de brotes de la zona meristemática de acuerdo al origen del material parental

Origen	Promedio de brotes por explante $\pm$ EE	Porcentaje de respuesta de los explantes	Total de brotes
<b>Micropropagado</b>	10.13 $\pm$ 0.74 <sup>a</sup>	79%	1885
<b>Convencional</b>	7.33 $\pm$ 0.46 <sup>b</sup>	48%	4298

Letras diferentes indican diferencias significativas.

En cuanto a las características morfológicas de las plantas, es las plantas convencionales son mayores que las plantas micropropagadas. Sin embargo, ambos promedios permanecen dentro del rango utilizado en reportes anteriores (*Robert et al.* 2006), en los cuales la altura de los hijuelos fue de 25 a 40 cm de altura.

El uso de material micropropagado presenta diversas ventajas, entre ellas, la facilidad de colecta y manejo del tejido, ya que éste puede mantenerse en condiciones controladas de laboratorio, y la presencia de microorganismos contaminantes es mucho menor. Cabe mencionar, que de forma adicional se realizaron experimentos utilizando material micropropagado y aclimatado en invernadero, el cual solo fue lavado y cortado para su inducción. Es decir, debido a la limpieza del tejido, se puede prescindir del proceso de desinfección en condiciones asépticas con un 20% de contaminación a los cuatro días de cultivo. Aunque esto implica el 20% de la pérdida del material, el daño es menor al tejido escaso obtenido de estas plantas micropropagadas, y así contar con mayor tejido para inducir la morfogénesis, ya que se ha determinado que los explantes que miden menos de 0.3 cm<sup>3</sup> pierden su capacidad de respuesta, y eso posiblemente se debe al proceso de desinfección que llega a ser demasiado agresivo.

---

Otra ventaja del uso de material micropropagado como material parental, fue la suavidad del tejido, que permite procesar mayor cantidad de plantas en menor tiempo y, por lo tanto, permite aumentar el número de plantas en la fase inicial de la micropropagación. Además, las plantas micropropagadas requieren de menor tiempo de procesamiento. Esto puede contribuir a la eficiencia horas-hombre para la obtención de los cogollos, con el menor daño posible a la hora de extraer la zona meristemática.

## 5. CONCLUSIÓN

Se observaron diferencias morfológicas entre las plantas aclimatadas, las plantas propagadas vía OD y aquellas propagadas vía ES.

Las plantas aclimatadas en invernadero incrementan su talla, sin embargo, el engrosamiento de la base y el diámetro del cogollo, así como la longitud del cogollo aumentó en plantas aclimatadas en vivero.

No existe un efecto claro entre la eficacia de la producción de brotes dependiente de la vía de propagación *in vitro*.

Las plantas aclimatadas en invernadero, produjeron un promedio mayor de brotes por explante, que aquellas aclimatadas en vivero.

La talla de las plantas aclimatadas, donadoras del material parental, resultó un factor significativo para la producción de brotes de la zona meristemática, siendo la talla de 30-35 cm, de plantas aclimatadas en invernadero, la que produjo mayor promedio de brotes por explante.

Existen diferencias significativas en la producción de brotes por explante del material parental de acuerdo al origen.

El uso de plantas micropropagadas para la obtención de material parental para la producción de brotes por explantes, resultó ventajoso debido a la practicidad del cogollo, limpieza de los explantes y porcentaje de respuesta, que las plantas convencionales.

---

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Abreu, E., G. González, R. Ortiz, P. Rodríguez, R. Domech, M. Garriga (2007). Evaluación de vitroplantas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem ) durante la fase de aclimatización. *Cultiv. Trop.* 28:5–11.
- Bhojwani, S.S., P.K. Dantu (2013). Micropropagation, en: Bhojwani, S., Dantu, P. (Eds.), *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. Springer India, India, pp. 245–274.
- Monja-Mio, K.M., M.L. Robert (2013). Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant.* 49:541–549.
- Murashige, T., F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473–497.
- Nikam, T.D. (1997). High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 51:225–228.
- Pospisilova, J., H. Synkova, D. Haisel, S. Semoradova (2007). Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO<sub>2</sub> concentration and abscisic acid (A review). *Acta Hortic.* 748-751.
- Preece, J. (2008). Stock Plant Physiological factors Affecting Growth and Morphogenesis, in: George, E., Hall, M., Klerk, G. De (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer, Dordrecht, Netherlands. 5005:403–422.
- Robert, M., J. Herrera, J. Chan, F. Contreras (1992). Micropropagation of *Agave* spp. *Biotechnol. Agric. For.* 19:306–329.
- Robert, M., J. Herrera, F., Contreras, K. Scorer (1987). *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 8:37–48.
- Robert, M.L., J.L. Herrera-Herrera, E. Castillo, G. Ojeda, M.A. Herrera-Alamillo (2006). An efficient method for the micropropagation of *Agave* species. *Methods Mol. Biol.*

---

318:165–178.

Robert, M.L., J.L. Herrera-Herrera, M.A. Herrera-Alamillo, A. Quijano-Ramayo, U.E. Balám (2004). Manual for the *in vitro* culture of Agaves 38. 145p.

Sluis, C. (2008). Integrating automation technologies with commercial micropropagation, in: Dutta-Gupta, S., Ibaraki, Y. (Eds.), Plant Tissue Culture Engineering. Springer, pp. 231–251.

---

**CAPÍTULO IV****CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS****1. CONCLUSIONES.**

En las plantas convencionales la talla de 20 a 29 cm fue la que se obtuvo mayor formación de brotes por explante.

El mes de febrero del 2014, que fue la temporada que presentó menor precipitación. Los hijuelos colectados durante este mes fueron los que produjeron mayor formación de brotes por explante,

Los análisis histológicos mostraron un gran contenido de células meristemáticas y los elementos traqueidales en la zona meristemática de plantas convencionales de talla entre 20 y 29 cm.

La mayor producción de brotes está ligada a la edad del tejido y a las condiciones ambientales durante la colecta de plantas cultivadas en campo de forma convencional.

Las plantas aclimatadas en vivero, presentaron mayor formación de hojas, engrosamiento de la base y diámetro del cogollo, que las plantas aclimatadas en vivero.

En las plantas micropropagadas, aquellas con una talla entre 35-40cm aclimatadas en invernadero, produjeron la mayor cantidad de brotes por explante, que los demás tratamientos.

Las plantas aclimatadas en invernadero produjeron el mayor promedio de brotes por explante.

Las plantas propagadas vía embriogénesis somática, fueron las que produjeron mayor cantidad de brotes, sin embargo, no se observó un efecto claro del tipo de vía de propagación en la formación de brotes.

La talla y el lugar de aclimatación presentó un efecto en la producción de brotes de la zona meristemática de plantas micropropagadas.

El material parental proveniente de micropropagación presentó mayor facilidad de

---

trabajo técnico que el material convencional.

Existe una relación entre la talla de las planta y la producción de brotes en ambos orígenes (microrpropagado y convencional).

El origen de la zona meristemática (convencional o micropropagado) influye en la velocidad de respuesta de los explantes a la morfogénesis.

El mejoramiento genético en los agaves, requiere de diversas estrategias de selección y caracterización de los materiales parentales para asegurar su constante calidad y productividad, sin embargo, las características idóneas de los materiales parentales están ligadas a las condiciones ambientales y el origen de cultivo.

## 2. PERSPECTIVAS

Actualmente, diversas especies de *Agave* han sido usadas como modelos para estudiar aspectos biológicos, bioquímicos y biotecnológicos de plantas perennes, monocotiledóneas y con metabolismo CAM, sin embargo, aún existen aspectos que carecen de estudio, y que pueden beneficiar el conocimiento y aplicación actual de este género.

Con los avances logrados en este trabajo, se abre la puerta para continuar los estudios sobre el mejoramiento del protocolo de micropropagación en las fases de multiplicación y crecimiento, mediante el uso de plantas micropropagadas como material parental y el posible escalamiento en biorreactores.

Por otra parte, estos estudios muestran que existe un comportamiento diferencial entre plantas micropropagadas con plantas convencionales, por lo que resulta interesante, conocer a fondo las características anatómicas, bioquímicas y genéticas del material micropropagado.

## ANEXOS

ANEXO 1: Medio de Cultivo Murashige y Skoog-B (modificado por Robert *et al.*, 1987)

	Componente	Concentración $\mu\text{M}$
MACRONUTRIENTES	KNO <sub>3</sub>	18000.0
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1500.0
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1250.0
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5000.0
MICRONUTRIENTES	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	100.0
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100.3
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	29.0
	KI	5.0
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.10
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.03
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.105
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2990.0
	VITAMINAS	Tiamina
Ácido Nicotínico		4.06
Piridoxina HCl		2.43
Na <sub>2</sub> EDTA		100.2
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		100.0
Mio-Inositol		555.0
Glicina		26.64
	Sacarosa	87640.0

---

## ANEXO 2: METODOLOGÍA PARA ANÁLISIS HISTOLÓGICO.

El proceso de histología se inició con la selección y la caracterización del material, como se menciona en las metodologías en cada capítulo. Seguido de la obtención de la zona meristemática, se llevó a cabo el siguiente listado de pasos.

### 1. Fijación del material

Éste se realizó con una solución fijadora compuesta de formaldehído: ácido acético glacial: alcohol (F.A.A) en proporción 3:2:1 y agua destilada. Los tejidos fueron sumergidos en dicha solución por siete días. Posteriormente, se lavaron con agua destilada hasta eliminar el olor del fijador.

### 2. Deshidratación

Los tejidos fueron sumergidos en diferentes concentraciones de etanol de forma gradual (30, 50, 70, 85 y 96%). En cada cambio, el tejido se expuso durante 120 min al vacío (20 min con bomba al vacío y 40 min al vacío por dos ocasiones).

### 3. Infiltración

Los tejidos fueron colocados en una mezcla de alcohol etílico anhidro más la solución de infiltración JB-4 solución A con el catalizador C en una proporción 1:1, respectivamente. Posteriormente, los tejidos fueron colocados en la solución de polímeros incrementado al doble, en esta ocasión sin alcohol. En cada cambio, la muestra se dejó 20 min bajo bomba de vacío. Posteriormente, los tejidos se pasaron durante 48 horas a la solución de infiltración del kit JB-4.

### 4. Inclusión

La mezcla de infiltración del kit de JB-4 solución B, para producir la polimerización, se realizó adicionando 1 ml de solución B mezclado con la solución de infiltración en 3.5 ml en ausencia de luz. Inmediatamente se colocó en los moldes en los que se situaron las muestras colocadas en la posición transversal. Posteriormente, se colocó el soporte en cada cavidad del molde y se dejó reposar para su endurecimiento.

## 5. Corte

Una vez que las muestras se encontraron fuera de los moldes, fueron seccionadas en un micrótopo de rotación Microm HM325, con un espesor de 3  $\mu\text{m}$ . Estos cortes fueron extendidos en un cristalizador con agua destilada, y colocados en un portaobjetos de manera seriada. Dichos portaobjetos, con los cortes, se colocaron en una plancha caliente para evaporar el agua contenida en la muestra.

## 6. Tinción

La tinción se realizó con el reactivo PAS, compuesto por una mezcla de ácido periódico y reactivo de Shiff, contrastado con azul de naftol. Para este paso se hidrolizó primeramente el tejido con ácido periódico durante 30 min, seguido de la reacción de Shiff durante 30 min. El tiempo del contraste con el azul de naftol fue de 30 minutos para todos los casos.

Posteriormente, se retiró el exceso de colorante con agua destilada. Las muestras se dejaron secar de forma vertical a temperatura ambiente.