



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE  
TUXTLA GUTIÉRREZ

---

RESIDENCIA PROFESIONAL

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ

“EVALUACIÓN DEL METANOSULFANATO DE ETILO PARA GENERAR VARIANTES  
SOMACLONALES DE *Agave tequilana* WEBER VARIEDAD AZUL RESISTENTE A *Fusarium  
oxysporum*”

PRESENTA: COUTIÑO CONSTANCIO CLAUDIA IVETH

ASESOR: DR. FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ MICELI

TUXTLA GUTIERREZ, CHIAPAS A 2 DE DICIEMBRE DEL 2013

## Contenido

1. Introducción.....	6
2. Justificación.....	7
3. Objetivos.....	7
3.1 Objetivo general.....	7
3.2 Objetivos específicos.....	7
4. Caracterización Del Área Donde Se Desarrolló El Proyecto.....	8
4.1 Historia Del Instituto Tecnológico De Tuxtla Gutiérrez.....	8
4.2 Misión.....	9
4.3 Visión.....	9
4.4 Localización.....	9
4.5 Instalaciones.....	10
4.6 Edificio Z.....	11
5. Problemas a resolver.....	11
6. Alcances y Limitaciones.....	12
7. Marco Teórico.....	12
7.1 Generalidades.....	12
7.2 Clasificación Taxonómica y Descripción.....	13
7.3 <i>Agave tequilana</i> Weber 1902 (Weber).....	14
7.4 Distribución.....	15
7.5 Regiones productoras.....	15
7.6 Precipitación, humedad ambiental y del suelo.....	16
7.7 Temperatura.....	16
7.8 Luz.....	17
7.9 Suelo.....	17
7.10 Reproducción del <i>Agave tequilana</i> weber.....	17
7.10.1 Reproducción sexual.....	18
7.10.2 Reproducción asexual.....	18
7.10.3 Bulbillos.....	19
7.10.4 Rizomas (Hijuelos).....	19
7.10.5 Sistema de propagación del <i>Agave tequilero</i> mediante hijuelos.....	20
7.11 Enfermedades Bióticas.....	24
7.11.1 Marchitez.....	24

7.11.2 Medidas de control de la marchitez.....	26
7.12 Embriogénesis Somática.....	28
7.13 Organogénesis in vitro.....	29
7.14 Variación Somaclonal.....	29
7.15 Alteraciones genéticas producidas durante el cultivo de tejidos. ....	31
7.16 Agentes Mutágenos.....	31
7.17 Marcadores moleculares. ....	33
7.18 Polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP). ....	34
7.19 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ....	35
7.20 Microsatélites (SSR).....	35
7.21 Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).....	36
7.22 Fragmentos polimórficos de DNA amplificados al azar (RAPD).....	36
7.23 Estudios sobre la aplicación de EMS en diversos cultivos.....	37
8. Procedimiento y Descripción de las Actividades Realizadas.....	39
8.1 Capacitación. ....	39
8.2 Preparación de medios PDA .....	39
8.3 Aislamiento de hongos patógenos en <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul. ....	39
8.4 Identificación morfológica de Hongos Patógenos. ....	39
8.5 Técnica de PCR para identificación de <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Fusarium solani</i> a partir de muestras de campo.....	40
8.6 Electroforesis. ....	41
8.7 Desinfección de Meristemas.....	41
8.8 Medio MS (Murashige y Skoog) Sin Regulador. ....	42
8.9 Medio MS (Murashige y Skoog) Con Regulador 0.5mg/L.....	42
8.10 Medio MS (Murashige y Skoog) Con Regulador 5mg/L.....	42
8.11 Preparación de medio MS sin regulador.....	43
8.12 Técnica de inoculación de Meristemas en Medio MS Sin Regulador.....	44
8.13 Desinfección y siembra de meristemas .....	45
9. Adición de Mutágeno. ....	50
10. Resultados.....	51
11. Conclusión.....	58
12. Bibliografía.....	59

---

### Índice de Figuras

---

<b>Figura 1</b>	Localización geográfica del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez	<b>Pág. 10</b>
<b>Figura 2</b>	Vista aérea de las instalaciones Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez	<b>Pág. 10</b>
<b>Figura 3</b>	Edificio en el cual se encuentra ubicado el laboratorio de Biotecnología Vegetal.	<b>Pág. 11</b>
<b>Figura 4</b>	<i>Agave tequilana</i> Weber	<b>Pág. 13</b>
<b>Figura 5</b>	Fotografía de <i>Agave tequilana</i> enferma de Marchitez	<b>Pág. 25</b>
<b>Figura 6</b>	Acción del agente mutágeno EMS a nivel de DNA	<b>Pág. 32</b>
<b>Figura 7</b>	Campana de Flujo laminar y material utilizado para la desinfección de meristemos.	<b>Pág. 45</b>
<b>Figura 8</b>	Muestras contaminadas por bacterias, en la primera desinfección.	<b>Pág. 46</b>
<b>Figura 9</b>	Muestras contaminadas por bacterias, en la primera desinfección.	<b>Pág. 46</b>
<b>Figura 10</b>	Frascos con muestras contaminadas por segunda ocasión	<b>Pág. 47</b>
<b>Figura 11</b>	Primeras muestras de meristemos asépticas inoculadas en medio MS sin regulador	<b>Pág. 47</b>
<b>Figura 12</b>	Resiembra de meristemos contaminados por bacterias.	<b>Pág. 48</b>
<b>Figura 13</b>	Meristemos trasplantados en medio MS con regulador	<b>Pág. 49</b>
<b>Figura 14</b>	Trasplante de callos del medio MS con reguladores de una concentración de 0.5mg/L a 5mg/L en campana de flujo laminar.	<b>Pág. 50</b>
<b>Figura 15</b>	<i>Fusarium oxysporum</i> colonias sobre PDA a los 5 días de cultivo a 28°C.	<b>Pág. 51</b>
<b>Figura 16</b>	<i>Fusarium solani</i> colonias sobre PDA a los 5 días de cultivo a 28°C.	<b>Pág. 51</b>
<b>Figura 17</b>	Primera formación de callo en la muestra núm. 1	<b>Pág. 62</b>
<b>Figura 18</b>	Desarrollo de Callos en la 4ª semana.	<b>Pág. 54</b>
<b>Figura 19</b>	Desarrollo de Callos en la 4ª y 5ª semana	<b>Pág. 56</b>
<b>Figura 20</b>	Aumento en la masa de callos en la 7ª semana	<b>Pág. 57</b>

---

---

### Índice de Cuadros

<b>Cuadro 1</b>	Características de varios métodos de marcadores moleculares.	<b>Pág. 34</b>
<b>Cuadro 2</b>	Diferencias morfológicas entre las especies de <i>Fusarium</i>	<b>Pág. 40</b>
<b>Cuadro 3</b>	Medio MS sin regulador	<b>Pág. 42</b>
<b>Cuadro 4</b>	Medio MS con regulador 0.5mg/L	<b>Pág. 42</b>
<b>Cuadro 5</b>	Medio MS con regulador para inducir el aumento de masa de callos	<b>Pág. 42</b>
<b>Cuadro 6</b>	Medio MS (200ml) sin regulador para la inoculación de 8 meristemos	<b>Pág. 43</b>
<b>Cuadro 7</b>	Reactivos y proporciones necesarios para la primera desinfección de meristemos	<b>Pág. 43</b>
<b>Cuadro 8</b>	Medio MS (200ml) con reguladores para la inoculación de meristemos	<b>Pág. 44</b>
<b>Cuadro 9</b>	Medio MS (150ml) con regulador para inducir el aumento de masa de callos	<b>Pág. 49</b>
<b>Cuadro 10</b>	Características morfológicas observadas al microscopio de <i>Fusarium oxysporum</i> presentes en tallo y <i>Fusarium solani</i> en raíces inoculadas en medio PDA a partir de <i>Agaves tequilana</i> contaminados.	<b>Pág. 52</b>

---

## 1. Introducción.

Los Agaves son cultivados en regiones áridas y semiáridas alrededor del mundo para su uso como fibra, alimentos de animales, planta ornamental y para las bebidas alcohólicas (Nobel, 1994). El género contiene 140 especies los cuales constituyen la mayoría de la familia Asparagaceae (Gentry, 1982).

El *Agave tequilana* Weber cultivo azul es el más ampliamente cultivado de las especies de agave, sus plantíos abarcan más de 84,000 hectáreas en 5 estados de la República Mexicana, siendo que su cultivo e industrialización para la producción de tequila genera un importante recurso económico (Rodríguez – Garay et al. 2008), representando millones de pesos en ganancias (Consejo Regulador del Tequila, 2006).

El Tequila es una bebida destilada, elaborada de la fermentación del jugo del *Agave tequilana* Weber variedad azul (Agave Azul). Tequila es la denominación de origen la cual es reconocida en el mundo entero y su producción es estrictamente regulada por el CRT (Consejo Regulador del Tequila) el cual está encargado de asegurar la autenticidad y calidad de la bebida (Cedeño, 1995)

En los últimos años se ha presentado una disminución en el rendimiento por daños a los cultivos, sobre todo por la presencia de hongos, bacterias e insectos y plagas. Los fitopatógenos reportados como más importantes en el agave tequilero son la bacteria *Erwinia carotovora* que produce la enfermedad llamada “pudrición del cogollo” y el hongo *Fusarium oxysporum* que produce la “pudrición seca de la raíz” o “marchitamiento”. Estas enfermedades que afectan el desarrollo de la planta, se reportaron en trabajos de investigación en los últimos 15 años (Valenzuela, 1994; Aceves, 2002; Virgen et al., 2004). El mejoramiento genético es una alternativa para hacer frente a los problemas de enfermedades en este cultivo, al generar plantas resistentes a plagas de insectos o potenciar alguna característica importante que pueda hacer más productiva a la planta y esto puede ser realizado a partir del cultivo de tejidos vegetales (Ruvalcaba et al. 2000).

Para la creación de variantes somaclonales resistentes a enfermedades o cualquier tipo de estrés, se ha utilizado mutágenos químicos, como el Metanosulfonato de Etilo (EMS) que pertenece al grupo de los agentes alquilantes,

ha sido reportado como un mutágeno muy eficaz y eficiente en cultivos tales como caña de azúcar, plátano, patata dulce, limón rough y crisantemo. Sin embargo, ninguna información ha sido reportada en la mutagénesis in vitro de *Agave tequilana* Weber Variedad Azul (Hofmann et al., 2004).

## **2. Justificación**

El cultivo del *Agave tequilana* weber variedad azul es la única fuente para la producción del tequila, los ingresos de esta práctica son para muchas familias dedicadas a su comercialización una muy importante fuente de ingresos económicos, principalmente en la zona centro del país.

Existen múltiples factores que afectan el crecimiento del *Agave tequilana*, como son la temperatura, las condiciones climáticas, la humedad, el calor, el suelo pero los que más preocupan son las plagas que pueden presentar durante el cultivo del agave.

Dentro de las plagas que más afectan al *Agave tequilana* se encuentra el *Fusarium oxysporum*, el cual produce la marchites siendo una de las causa de perdida completa de centenares de cultivos al año. En el presente trabajo se pretende crear una variante somaclonal resistente a *Fusarium oxysporum* mediante su exposición a un agente mutágeno.

## **3. Objetivos.**

### **3.1 Objetivo general.**

Evaluar el efecto del metanosulfanato de etilo para inducir variantes somaclonales de *Agave tequilana* resistentes a la infección por *Fusarium oxysporum*

### **3.2 Objetivos específicos.**

Inducir la formación de callos de *Agave tequilana* utilizando meristemas como explante y 2,4-D como regulador del crecimiento vegetal.

Determinar la influencia de diferentes concentraciones de metanosulfonato de etilo aplicado a diferentes tiempos de contacto sobre la sobrevivencia de los callos de *A. tequilana*.

Evaluar la resistencia a la infección por *Fusarium oxysporum* en los callos de *Agave tequilana*.

#### **4. Caracterización Del Área Donde Se Desarrolló El Proyecto.**

##### **4.1 Historia Del Instituto Tecnológico De Tuxtla Gutiérrez.**

En la década de los 70's, se incorpora el estado de Chiapas al movimiento educativo nacional extensión educativa, por intervención del Gobierno del Estado de Chiapas ante la federación.

Esta gestión dio origen a la creación del Instituto Tecnológico Regional de Tuxtla Gutiérrez (ITRTG) hoy Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez (ITTG).

El día 23 de agosto de 1971 el Gobernador del Estado, Dr. Manuel Velasco Suárez, colocó la primera piedra de lo que muy pronto sería el Centro Educativo de nivel medio superior más importante de la entidad.

El día 22 de octubre de 1972, con una infraestructura de 2 edificios con 8 aulas, 2 laboratorios y un edificio para talleres abre sus puertas el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez con las carreras de Técnico en Máquinas de Combustión Interna, Electricidad, Laboratorista Químico y Máquinas y Herramientas.

En el año 1974 dio inicio la modalidad en el nivel superior, ofreciendo las carreras de Ingeniería Industrial en Producción y Bioquímica en Productos Naturales.

En 1980 se amplió la oferta educativa al incorporarse las carreras de Ingeniería Industrial Eléctrica e Ingeniería Industrial Química.

En 1987 se abre la carrera de Ingeniería en Electrónica y se liquidan en 1989 las carreras del sistema abierto del nivel medio superior y en el nivel superior se



reorientó la oferta en la carrera de Ingeniería Industrial Eléctrica y se inicia también Ingeniería Mecánica.

En 1991 surge la licenciatura en Ingeniería en Sistemas Computacionales. Desde 1997 el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez ofrece la Especialización en Ingeniería Ambiental como primer programa de postgrado.

En 1998 se estableció el programa interinstitucional de postgrado con la Universidad Autónoma de Chiapas para impartir en el Instituto Tecnológico la Maestría en Biotecnología.

En el año 1999 se inició el programa de Maestría en Administración como respuesta a la demanda del sector industrial y de servicios de la región.

A partir de 2000 se abrió también la Especialización en Biotecnología Vegetal y un año después dio inicio el programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica y la Licenciatura en Informática.

#### **4.2 Misión.**

Formar de manera integral profesionistas de excelencia en el campo de la ciencia y la tecnología con actitud emprendedora, respeto al medio ambiente y apego a los valores éticos.

#### **4.3 Visión.**

Ser una institución de excelencia en la educación superior tecnológica del sureste, comprometida con el desarrollo socioeconómico sustentable de la región.

#### **4.4 Localización.**

Carretera Panamericana Km 1080 Colonia Terán, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas CP 29050 el cual podemos observarlo en la figura 1

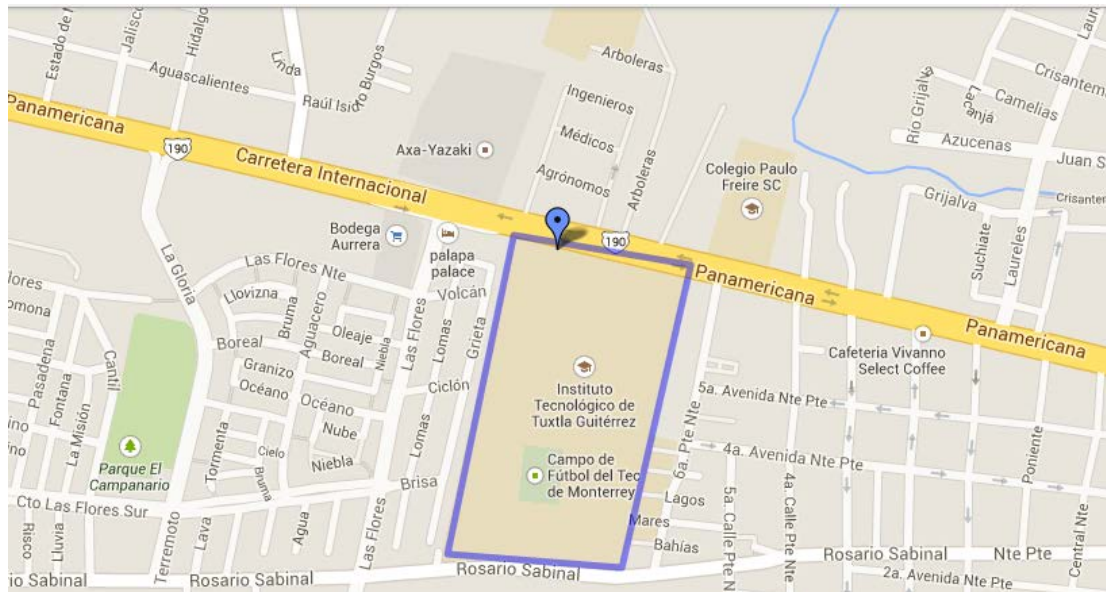


Figura 1. Localización geográfica del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

#### 4.5 Instalaciones.

Las cuales podemos observarla en la figura 2

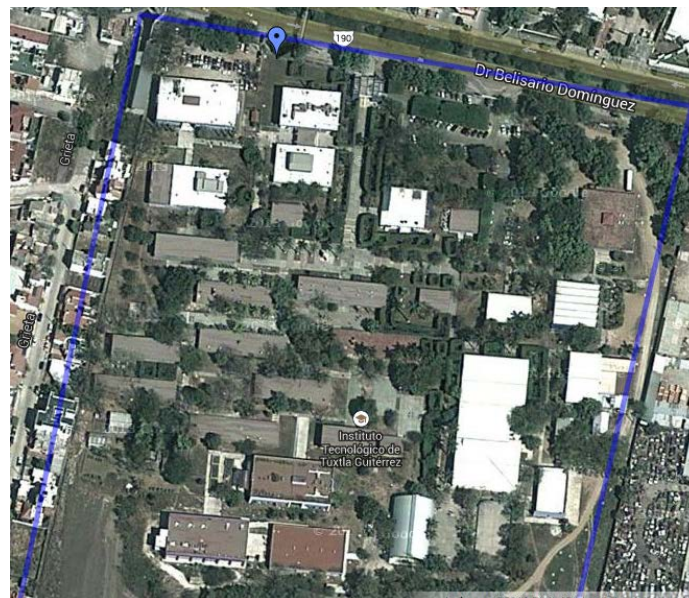


Figura 2. Vista aérea de las instalaciones Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez

## 4.6 Edificio Z.

Figura 3



Figura 3. Edificio en el cual se encuentra ubicado el laboratorio de Biotecnología Vegetal.

## 5. Problemas a resolver

Indudablemente, las enfermedades de las plantas son consideradas como uno de los factores que afectan severamente a la producción agrícola. El cultivo de agave no ha escapado a esta situación, ya que se ha visto afectado por una serie de fitopatógenos que reducen el desarrollo normal, e incluso, pueden llegar a causar la muerte de la planta (Martínez et al., 1998).

En 1987 el agave tequilero presentó un problema que alertó a todos los agricultores de este cultivo: las hojas de las plantas mostraron un enrollamiento anormal, posteriormente se observó una necrosis regresiva, secamiento total de las hojas y finalmente la muerte de la planta (Aceves, 2003). El nombre que se le dio fue marchitez o tristeza del agave (Aceves, 1999; Fucikovsky, 2004); el agente causal de esta enfermedad ha sido citado principalmente como *Fusarium oxysporum* (Luna, 1996).

Mediante esta investigación se espera obtener variantes somaclonales de *Agave tequilana* weber variedad azul que tengan resistencia a la infección por parte de *Fusarium oxysporum*.

## 6. Alcances y Limitaciones

Durante la investigación se alcanzó la etapa de inducción de callos los cuales se mantienen en crecimiento y se consiguió la identificación de *Fusarium oxysporum* (en tallo) y *Fusarium solani* (en raíz) en plantas infectadas.

De las limitantes de la investigación, la principal es el tiempo que se requiere para poder obtener la masa suficiente de callos embriogénicos debido a que tan solo las primeras inducciones de callos requieren de un tiempo de 3 semanas en medio MS suplementado con 2, 4 D; y a partir de este momento se requiere de al menos 3 meses para obtener la masa de callos necesaria para aplicar el agente mutagénico, así como la dificultad para, que tiene nuestro estado contar con los callos ya que *Agave tequilana* se encuentra distribuida entre los 5 y 25° de latitud norte y se adapta a regiones subtropicales semiáridas y subhúmedas con régimen térmico templado, semicálido o cálido, actualmente, se encuentra en municipios de los estados de Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Nayarit y Tamaulipas (Ruiz et al., 1999).

En el periodo de Agosto a Diciembre no se alcanzó a obtener la suficiente masa de callos para exponerlo al mutágeno, por lo cual se le seguirá dando continuidad, debido a que las plantas se trajeron de sembradíos de agave del Tecnológico de Tlajomulco a las cuales se les dio el tratamiento de desinfección para mantenerlas en condiciones *in vitro*, pero como la carga microbiana que presentaba era alta, se hizo necesario realizar tres desinfecciones, posteriormente se realizó la siembra de los explantes ya desinfectados en medio MS suplementado con 2, 4 D y después de tres semanas se observó la primera formación de callos, pero aun la masa no es suficiente.

## 7. Marco Teórico

### 7.1 Generalidades.

El género *Agave*, cuyo significado es “noble” o “admirable”, fue dado conocer por Carlos Lineo en 1753. Dicho género comprende aproximadamente 200 especies, de las cuales el 75 % se encuentran en México, lugar considerado el centro de

origen. Junto con el frijol y el maíz, el agave fue una de las primeras plantas cultivadas en Mesoamérica y gracias a su gran cantidad de usos, es también considerado como el “árbol de la vida” (Rodríguez-Garay B, 2004)

## 7.2 Clasificación Taxonómica y Descripción

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida (Monocotiledóneas)

Subclase: Liliidae

Orden: Liliales

Familia: Agavaceae

Género: Agave

Subgénero: Agave

Sección: Rigidae

Especie: *Agave tequilana* Weber (la observamos en la figura 4)



Figura 4 *Agave tequilana* Weber (Foto de Pérez-Liñán, A., 2009).

Se caracteriza por su difícil determinación taxonómica ya que existen autores que no reconocen al género Agave dentro de la familia Agavaceae, sino lo incluyen

dentro de la familia Amarylidaceae o la familia Liliaceae. Por otro lado, la clasificación propuesta por Dahlgren es la más aceptada pues ha sido basada en análisis morfológicos y moleculares; en ella Daghler considera que la familia Agavaceae incluye 8 géneros con 295 especies, de los cuales 125 especies (75 %) se encuentran en México. (Rodríguez-Garay B, 2004)

### **7.3 *Agave tequilana* Weber 1902 (Weber)**

Planta suculenta que se extiende radicalmente de 1.2 a 1.8 m de longitud, su tallo es grueso, corto de 30 a 50 cm. de altura al madurar. Las hojas de 90 a 120 cm lanceoladas, acuminadas de fibras firmes, casi siempre rígidamente estiradas, cóncavas de ascendentes a horizontales; lo más ancho se encuentra hacia la mitad de la hoja, angosta y gruesa hacia la base, generalmente de color glauco azulado a verde grisáceo. El margen es recto a ondulado o retando, los dientes generalmente de tamaño regular y espaciados irregularmente, en su mayoría de 3 a 6 mm de largo a la mitad de la hoja. Los ápices delgados, curvos o flexos desde poca altura de la base piramidal de color café claro a obscuro, de 1 a 2 cm de largo, raramente larga achatada o abiertamente surcada de arriba, la base ancha, café obscura decurrente o no decurrente. La inflorescencia es una panícula de 5 a 6 ms de altura, densamente ramosa a lo largo, con 20 a 25 umbelas largas difusas de flores verdes y estambres rosados. Flores de 68 a 75 mm de largo con bractéolas (Hoja que nace del pedúnculo de las flores de ciertas plantas, y suele diferir de la hoja verdadera por la forma, la consistencia y el color.) sobre los pedicelos de 3 a 8 mm de longitud. Ovario de 32 a 38 mm de largo, cilíndrico con cuello corto, inconstricto (amplio), casi terminado en punta sobre la base, un tubo floral de 10 mm de ancho, funeliforme (con forma redonda) surcado, los pétalos desiguales de 25 a 28 mm de longitud por 4 mm de ancho, lineares, erectos pero rápidamente flojos en anthesis, cambiando entonces a color café y secos.

Filamentos de 45 a 50 mm de longitud, dobladas hacia adentro junto al pistilo, insertos de 5 a 7 mm cerca de la base de tubo; anteras de 25 mm de largo. El fruto es una cápsula ovalada a brevemente cúspida. (Ruiz et al., 1999)

#### **7.4 Distribución**

Este género se distribuye a lo largo del continente americano en zonas que van desde los 40 grados latitud norte hasta los 20 grados latitud sur. Al norte se encuentra presente en zonas áridas y semiáridas de Norteamérica y México, bajando por las islas del Caribe hasta Colombia y Venezuela. En la cuenca Europea del Mediterráneo fueron introducidas con fines ornamentales, posteriormente se dispersaron fuera de los cultivos y actualmente se encuentran naturalizados. (Rodríguez-Garay B, 2004)

#### **7.5 Regiones productoras**

Se establece como territorio de origen el comprendido por la totalidad de los municipios en donde se cultiva el agave del Estado de Jalisco; en el Estado de Guanajuato, los municipios de Abasolo, Ciudad Manuel Doblado, Cuerámara, Huanímaro, Pénjamo, Purísima del Rincón y Romita. Los municipios de Briseñas de Matamoros, Chavinda, Chilchota, Churintzio, Cotija, Ecuandureo, Jacona, Jiquilpan, Maravatío, Nuevo Parangaricutiro, Numarán, Pajacuarán, Peribán, La Piedad, Régules, Los Reyes, Sahuayo, Tancítaro, Tangamandapio, Tangancícuaro, Tanhuato, Tingüindín, Tocumbo, Venustiano Carranza, Villamar, Vistahermosa, Yurécuaro, Zamora y Zináparo, del Estado de Michoacán. Los municipios de Ahuacatlán, Amatlán de Cañas, Ixtlán, Jala, Xalisco, San Pedro de Lagunillas, Santa María del Oro y Tepic, del Estado de Nayarit y del Estado de Tamaulipas, los municipios de Aldama, Altamira, Antigua de Morelos, Gómez Farías, González, Llera, Mante, Nuevo Morelos, Ocampo, Tula y Xicoténcatl. (Ruiz et al., 1999)

Aunque el *A. tequilana* se adapta a un amplio rango altitudinal, parece favorecerle el intervalo que va de 1,000 a 2,200 msnm. En altitudes inferiores a 1,000 m, el desarrollo inicial del cultivo es rápido y prometedor, por lo que sitios con estas características tienen potencial para la producción de planta, no así para la producción de «piña», ya que ésta, aunque puede adquirir un volumen considerable, generalmente y bajo un manejo convencional, no adquiere las

características deseables y requeridas por la industria del tequila, sobre todo en cuanto a la concentración de azúcares se refiere (Ruiz et al., 1999; Vargas, 2004).

En altitudes superiores a 2 200 msnm, la velocidad de desarrollo del cultivo se reduce significativamente y el riesgo de daño por bajas temperaturas y/o heladas se incrementa de manera significativa (Ruiz et al., 2003; Vargas, 2004).

#### **7.6 Precipitación, humedad ambiental y del suelo.**

El agave prospera bajo un régimen de precipitación anual de 700 a 1 000 mm y una atmósfera de seca a moderadamente seca la mayor parte del año (Ruiz et al., 1999). Sin embargo, Vargas (2004) señala un intervalo óptimo de lluvia acumulada anual de 600 a 1 800 mm. Las regiones productoras de agave más importantes, localizadas en el Estado de Jalisco, México, presentan una precipitación anual que va de 700 a 1 100 mm (Ruiz et al., 1997b; Ruiz et al., 1998; Flores et al., 2003; Ruiz et al., 2003b).

#### **7.7 Temperatura.**

El *Agave tequilana* es una planta que presenta pobre tolerancia a las bajas temperaturas, en comparación con la mayoría de especies de la familia Agavaceae (Nobel y Smith, 1983; Nobel, 1988). La absorción celular se reduce a la mitad cuando las temperaturas descienden al nivel de -6 °C. Por esta razón el *A. tequilana* probablemente no puede cultivarse en regiones donde, aun ocasionalmente, se presenten temperaturas de -7 °C o inferiores. Por otro lado, la hoja de este agave puede tolerar temperaturas hasta de 55 °C (Nobel et al., 1998).

Dado que es una planta MAC, el agave es muy sensible a las temperaturas nocturnas. La asimilación de CO<sub>2</sub> se favorece con temperaturas diurnas/nocturnas de bajas a moderadas y disminuye drásticamente en ambientes donde, sobre todo, las temperaturas nocturnas son elevadas. En estas condiciones también se incrementa la respiración (Nobel et al., 1998; Pimienta et al., 2000).



### **7.8 Luz.**

El *Agave tequilana* es una especie que se comporta mejor cuando se presentan días soleados la mayor parte del año, por lo que en una localidad en la que se pretenda introducir este cultivo, el periodo de lluvias no deberá ser muy prolongado. Aunque la cantidad de luz, expresada en flujo de fotones fotosintéticos, constituye un factor ambiental limitante para la fotosíntesis en plantas MAC (Gibson y Nobel, 1986).

### **7.9 Suelo.**

Los agaves prefieren suelos de textura media, por ejemplo suelos francos, franco-arenosos o franco-arcillosos. Aunque en zonas con baja precipitación, los agaves prefieren suelos con mayor retención de humedad, es decir suelos de textura pesada, como arcillosos o limo-arcillosos, pero pueden desarrollarse adecuadamente en suelos delgados o profundos. Además, el género *Agave* presenta tolerancia de ligera a intermedia a sales y prospera mejor en un rango de pH de 6.0 a 8.0; y no son recomendables suelos con problemas de acidez o alcalinidad para su cultivo (FAO, 1994).

### **7.10 Reproducción del *Agave tequilana weber***

La selección del *Agave tequilana* Weber var. azul, dentro de los agaves mezcaleros se inició durante el siglo XIX, con base en la preferencia por la menor duración de su ciclo para madurar; por el gusto de los tequileros hacía el producto obtenido a partir de su procesamiento; por su mayor producción de azúcar e hijuelos; así como por su menor contenido de fibra, lo que facilita el proceso. El uso de esta variedad se hizo obligatorio durante el siglo pasado, al emitirse la Norma Oficial Mexicana para la producción de tequila. Dicha norma especifica la variedad azul de *Agave tequilana* como la única autorizada para elaborar tequila.

La planta de *Agave tequilana* Weber var. azul se reproduce por las vías sexual y asexual:

### **7.10.1 Reproducción sexual.**

En el ciclo sexual se realiza la propagación por semilla, para obtener nuevas plantas individuales con las características que presentan los genes propios de los gametos masculinos y femeninos. En la reproducción por semillas puede esperarse que se presente variación genética o segregación entre las plantas hijas.

La floración de agave ocurre cuando se presenta la emisión del escapo floral o quiote, indicando el final de su ciclo de crecimiento, al ser ésta una especie con crecimiento determinado y un solo punto de emisión de hojas. Dentro del cultivo del agave para la producción de tequila, normalmente se elimina el escapo floral cuando inicia su crecimiento, para evitar que la planta consuma los azúcares acumulados en el tallo o piña. El empleo del método de propagación por semilla en el género *Agave* implicaría problemas por variación genética al estar sujeto a polinización cruzada y por dificultades para mantener un abasto ordenado, debido a lo prolongado del ciclo de crecimiento, que toma de 6 a 8 años para alcanzar la etapa de floración y producción de semilla. Los estudios realizados con semillas muestran también una viabilidad baja de las mismas.

### **7.10.2 Reproducción asexual**

La reproducción asexual es aquella que no involucra el proceso sexual, la reproducción vegetativa de varios tipos de plantas ocurre tanto a partir de hojas como de tallos y raíces, obteniéndose con mayor frecuencia resultados positivos con los tallos. Los individuos obtenidos mediante este tipo de reproducción constituyen un clon y estos clones, a excepción de mutaciones naturales, son genéticamente idénticos a la planta madre. La selección y mantenimiento de cultivares en cultivos frutales se realiza por este método, transfiriendo los tejidos por medio de injertos. Entre las diferentes formas de reproducción asexual se encuentran: La reproducción por bulbillos, rizomas (hijuelos); el empleo de esquejes, acodos e injertos; y los métodos de propagación masiva en laboratorios de cultivo de tejidos.

Para la propagación de *Agave tequilana* Weber, var. Azul, existen los siguientes métodos de multiplicación asexual:

### **7.10.3 Bulbillos.**

Son plántulas producidas a partir de meristemas de la planta madre, por lo cual son clones de la misma, que al completar su desarrollo caen al suelo, donde desarrollan raíces y crecen como plantas independientes. Este fenómeno se presenta en algunos agaves que desarrollan bulbillos a partir de los meristemas axilares de la inflorescencia, en la base de las flores. El agave azul posee esta característica.

Este método de propagación presenta desventajas por ocurrir después de la floración, tras el ciclo completo de producción del agave. También puede ocurrir que al desarrollarse los bulbillos se propaguen las enfermedades que pudieran existir en la planta madre. Aunado a estos problemas, el costo es mayor que cuando se propaga por hijuelos rizomatosos. Por estas razones no es un método utilizado con frecuencia.

### **7.10.4 Rizomas (Hijuelos).**

Los rizomas son tallos subterráneos que crecen generalmente en un plano horizontal, paralelo a la superficie del terreno. A diferencia de las raíces, los rizomas poseen yemas en la cara superior de donde se originan hojas y partes aéreas que conformarán una nueva planta y por la cara inferior generan raíces adventicias. Cada año los rizomas emiten yemas que originan nuevos órganos aéreos.

La propagación por rizomas es la más utilizada en agaves, no sólo porque conserva las características genéticas de la planta madre, sino porque el desarrollo de las plantas es más rápido y vigoroso que por bulbillos. Plantas producidas por micropropagación

Las técnicas de micropropagación o propagación in vitro tienen la ventaja de producir grandes cantidades de plantas en espacios relativamente reducidos durante todo el año. Para la propagación in vitro es necesario que las plantas sean capaces de regenerar. La habilidad de regeneración está determinada por el genotipo, las condiciones ambientales (fuente de nutrimentos, reguladores y condiciones físicas) y el estado de desarrollo de la planta. Las técnicas más comunes de micropropagación son la proliferación de yemas axilares, la organogénesis y la embriogénesis somática. La propagación in vitro permite controlar la condición sanitaria de las plantas a lo largo de su producción y constituir grupos de plantas de la misma edad para su manejo agrícola. Este procedimiento permite reproducir en gran número plantas provenientes de individuos seleccionados con base en características fenotípicas y realizar un programa de mejoramiento genético a través de propagación clonal.

#### **7.10.5 Sistema de propagación del Agave tequilero mediante hijuelos**

El manejo común de la propagación del agave en la DOT corresponde a un manejo tradicional basado en conocimiento empírico aplicado para optimizar la producción de hijuelos y consiste en las siguientes prácticas:

1. Preparación y producción de hijuelos.
2. Elección de planta madre.
3. Selección del hijuelo.
4. Transporte de hijuelos.

La tecnificación del cultivo de agave sigue un patrón hacia la homogeneidad de las plantaciones, que en la actualidad se controla solamente con la selección de tamaño de la “cabeza” del hijuelo.

#### **1. Preparación y producción de hijuelos**

Los intensos laboreos de preparación de los suelos para las plantaciones realizados con maquinaria agrícola en los predios o plantaciones que lo permiten,

favorecen la creación de una estructura que aumenta la captación y almacenamiento de humedad y facilita el crecimiento de rizomas y la brotación de “hijuelos” hacia la superficie del suelo. Algunos agricultores o productores repiten la práctica del subsoleo antes de la época de lluvias con la intención de producir más “hijuelos”. Si el objetivo es desarrollar “hijuelos” de buena calidad (peso y volumen), se suspenden las labores al suelo en cuanto éstos han emergido. Si la demanda de hijuelos desciende, los productores “desbotan” (deshijan) mecánicamente las plántulas en cualquier edad de la plantación. La diferencia fundamental entre el “arranque” y el “desbote” es el interés sobre los “hijuelos”, si se van a plantar o a destruir.

La mejor edad de las plantas para generar hijuelos es entre los 3 y 5 años cuando se obtienen hijuelos más viables para las nuevas plantaciones.

## **2. Elección de las plantas madre**

En la elección de las plantas madres se tiene que considerar: a. Edad de la planta madre: que la planta tenga entre 3 y 5 años de establecida en el predio, etapa en la cual la planta madre está en pleno desarrollo vegetativo y en mejores condiciones de poder alimentar a los hijuelos que emergen.

## **3. Selección de hijuelos**

La selección de los hijuelos es una de las etapas más importantes para el establecimiento de la plantación ya que de esto depende en gran medida la calidad de la misma. En la selección de los hijuelos son varias las etapas a realizar:

### **3.1 Arranque de los hijuelos.**

### **3.2 Selección y clasificación de los hijuelos arrancados.**

### **3.3 Desinfección de hijuelos arrancados y herramientas.**

### **3.1 Arranque de los hijuelos**

a. Condiciones del terreno: es importante conocer las condiciones en que se encuentra el terreno donde se va a realizar el arranque del hijuelo, ya que esto determinará las dificultades de la práctica y el tiempo y cantidad de arrancadores necesarios para llevarla a cabo. Dentro de los aspectos a considerar está la topografía del terreno, si es plano, ladera, suelto o compacto, con pedregosidad superficial o interna, presencia de maleza o sin ella, si la densidad de plantación es alta o baja.

b. Arranque del hijuelo: debe realizarse con un implemento conocido como barretón, que es una placa metálica, que sirve para cortar el rizoma que une al hijuelo con la planta madre. Este corte se realiza de un solo golpe mediante un corte limpio y transversal al rizoma.

### **3.2 Selección y clasificación de los hijuelos arrancados**

La selección de los hijuelos afectará la calidad de la plantación y por consiguiente, la producción de la materia prima para el tequila y el beneficio económico que se obtenga de la cosecha. Una planta puede producir durante su vida hasta 15 plántulas o hijuelos de diferentes calidades. Bajo un buen manejo agrícola una plantación de 4 años, puede producir en promedio 3 hijuelos de primera, (1.5 a 3 kg) y 6 de segunda (0.5 a 1.5 kg) por cada planta madre.

a. Selección de los hijuelos: Esta acción la debe realizar un técnico o agricultor capacitado ya que de esta acción depende el éxito o el fracaso de las plantaciones. Se deben considerar los hijuelos más vigorosos, sanos, de color azul intenso, los que están más retirados de la planta madre, y que no muestran rastros de insectos.

Clasificación de los hijuelos. Se debe hacer con base en los siguientes puntos.

- Verificar que la planta madre sea de la variedad azul.
- Verificar que la plantación esté dentro de la DOT.
- Verificar que la plantación esté registrada ante el CRT.

- Verificar que los hijuelos provengan de plantas madres de la misma edad.
- Conocer el historial de manejo de la plantación y origen del material de la plantación original.
- Determinar el tamaño del hijuelo (que sea uniforme). Para medir este aspecto el agricultor se basa en el tamaño de las hojas, que puede ser de media vara a vara completa (de 0.40 a 0.85 m). Para estimar el tamaño de la piña se toma como referencia los tamaños de frutas, limón, mandarina, naranja, toronja y piña

### **3.3 Desinfección de hijuelos arrancados y herramientas.**

a) Los hijuelos preparados deben de bañarse con una solución desinfectante inmediatamente después del tostoneo y antes de ser clasificados. Se puede utilizar una solución de hipoclorito de sodio al 10 por ciento aplicada por aspersión a las zonas de corte en la base de la planta y en las hojas.

b) Toda la herramienta utilizada para el arranque y la preparación de los hijuelos (coas, barretones, machetes y talaches) debe ser desinfectada con una solución de Cloro al 10 por ciento, posterior al arranque de 100 hijuelos, al menos cada vez que se cambia de predio de trabajo y/o cuando se esté trabajando en plantaciones de dudosa sanidad, ya que existe la posibilidad de trasladar fuente de inóculo (bacterias, hongos y nematodos).

### **4. Transporte de hijuelos**

Es necesario evitar el daño a los hijuelos durante las labores de transporte entre los predios de arranque, centros de acopio y predios de nueva plantación. Para ello se deben de tomar las medidas siguientes:

a) Desinfectar la caja del camión antes y después de cada carga de hijuelos, así como desinfectar las llantas con Hipoclorito de sodio antes y después de entrar a una plantación de agave.

b) No pisotear los hijuelos ya cargados en el camión.

- c) No provocar demasiadas heridas a los hijuelos.
- d) Si el hijuelo presenta heridas originadas por la poda, insectos, no se recomienda someter al hijuelo a la presión del herbicida glifosato, una vez establecido en el predio.

### **7.11 Enfermedades Bióticas.**

Las enfermedades causadas por organismos vivos o parasitarios afectan considerablemente la producción agrícola. Para que éstas ocurran los requisitos básicos son:

- Hospedante o planta susceptible.
- Patógeno virulento presente.
- Condiciones ambientales favorables (Agrios, 1978; García, 1982).

#### **7.11.1 Marchitez.**

El agente causal de esta enfermedad es el hongo *Fusarium oxysporum*. La marchitez que se presenta en el cultivo de agave se debe a una deshidratación de los tejidos y esto se da a su vez porque hay una reducción, muerte o destrucción del sistema radical, o bien porque hay destrucción o taponamiento de haces vasculares (Castañeda-Vásquez, 2002).

Aunque esta enfermedad era observada en plantaciones de agave mayores de 3 años, actualmente se le encuentra en plantas de un año. En plantaciones nuevas su síntoma es el característico “clavo”.

En general, en casi cualquier planta de agave de la cual se tomen algunas muestras de raíz, se aislará a *Fusarium sp* aunque la planta no manifieste síntoma alguno, esto es debido a que este hongo es habitante natural del suelo, además de ser un parásito facultativo, o sea que puede sobrevivir en materia orgánica sin que haya un hospedante establecido (Timmer, 1982). Es más probable que penetre a las raíces por medio de heridas a que penetre de manera natural. Con el incremento de la marchitez, las hojas se encarrujan y se secan, la planta se



arranca muy fácilmente (Jones et al, 1989), podemos observar estos daños en la figura 5.



Figura 5. Fotografía de *Agave tequilana* enferma de Marchitez

Es importante conocer los principales factores que pueden inducir una marchitez en las plantas, para saber qué métodos o prácticas pueden ser empleadas para prevenir o reducir la incidencia de la misma, así con el manejo del cultivo no se busca eliminar a *Fusarium sp* de los suelos donde se cultive el agave, sino mantenerlo en un grado tal que no provoque daños de importancia económica, esto es, que no provoque síntomas significativos que afecten el desarrollo o bien que llegue a provocar la muerte de las plantas.

Para el caso de marchitez, es poco útil el uso de fungicidas con base en cobre, debido principalmente a que el problema se presenta en raíz y no en follaje. Aunque se ha visto (pruebas de laboratorio) que el sulfato de cobre pentahidratado tiene efectividad contra *Fusarium sp*, cuando ataca raíz es muy difícil que alcance la concentración necesaria para su eliminación, y más aún si se supone que pueda haber infectado alguna raíz y ya se encuentre dentro de la planta (Soltero,

2002). Otro aspecto a considerar es que el cobre es un elemento que en altas concentraciones es inhibidor de la emisión de nuevas raíces, se utiliza en algunos viveros para dirigir las raíces en una misma dirección dentro del cepellón).

### **7.11.2 Medidas de control de la marchitez**

#### **Uso de planta sana**

Establecer una plantación utilizando hijuelo o planta sana tiene muchas ventajas, ya que hay mayor probabilidad de prendimiento de los hijuelos y establecimiento de las plantas, así como un desarrollo más adecuado invariablemente se ha aislado Fusarium, presentan marchitez después de tres o cuatro años de haber sido plantados (Aceves, 2003).

Para reducir riesgos de seleccionar planta enferma, se debe arrancar hijuelo de predios que no tengan plantas enfermas, o bien evitar aquellas que presenten síntomas de marchitez o clorosis, esto porque es posible que si hay infección en la planta madre, entonces haya un contagio de hijuelos por el rizoma. Después de arrancar el hijuelo, desinfectar la herramienta con que se esté llevando a cabo la labor, para reducir la diseminación de la enfermedad.

Al preparar el hijuelo (tostonear), se deben eliminar aquellos que presenten clavo o daño por insectos; además de desinfectarlos por medio de inmersión con fungicidas a base de cobre.

Aunque trabajos de campo en otros ambientes indican que la inmersión de los hijuelos en la solución reduce la tasa de rendimiento de la planta en campo, por lo que es preferible una aspersion manual con sulfato de cobre (Uvalle 2002).

#### **Aplicación de materia orgánica**

La aplicación de materia orgánica es sumamente importante debido a que da una mejor estructura al suelo, además de que funciona como un buffer que evita

cambios de pH y en general hace más disponibles muchos nutrientes así como proporcionar otros elementos necesarios para las plantas (Rojas, 1993).

Debido a que la materia orgánica es un sustrato para microorganismos que la descomponen, esto permite incrementar las poblaciones de los mismos y muchos de estos son organismos antagónicos a diversos patógenos del suelo, o incluso pueden ocupar espacios que antes estarían disponibles únicamente para los fitopatógenos (Fückikovsky, 2000).

La materia orgánica que se aplique debe ser incorporada para evitar pérdidas por viento o por lavado, además lo que se persigue al aplicar materia orgánica es mejorar el suelo que se encuentra alrededor de la zona radical, ya que es la zona que interesa tener en mejores condiciones, tanto para mejorar la disponibilidad de nutrimentos como para favorecer el desarrollo toneladas por hectárea de composta como materia orgánica, aplicadas en los surcos, antes del trasplante de plantas.

### **Aplicación de Cal.**

Cuando se tienen suelos ácidos, la aplicación de cal permite balancear el pH de los mismos. Muchos nutrimentos que se encuentran en el suelo, o que se adicionan a suelos ácidos no pueden ser tomados por las plantas debido a que se fijan por efecto del pH, pero al agregar cal éstos se hacen más disponibles (Tisdale y Werner, 1996).

Se sabe que *Fusarium sp* puede desarrollarse mejor cuando se tiene un pH ácido en el suelo, alrededor de 5 a 5.5, así que si se aplica cal se torna más desfavorable el ambiente para el desarrollo de este hongo (Fückikovsky y Velásquez, 2001).

Cuando se aplica cal, se tienen mejores resultados en la regulación del pH si ésta es incorporada, ya que el intercambio de cationes se da a nivel de la raíz,

permitiendo así que la planta pueda absorber los nutrientes. Cuando se aplica en forma superficial sin que sea incorporada, puede reaccionar mientras se va incorporando por efecto de la lluvia, y al llegar al nivel de la raíz ya no da el efecto regulador de pH que se esperaba.

En suelos de origen ácido, ya sea por el material parental, o por las condiciones climáticas, es importante aplicar cal al inicio de cada temporada de lluvias, para permitir una mejor disponibilidad de los nutrientes, así como para mantener un suelo más estable.

### **7.12 Embriogénesis Somática**

La embriogénesis somática se define como el proceso por el cual las células somáticas haploides o diploides se desarrollan en plantas diferenciadas pasando por las etapas características embriológicas sin que exista la fusión de gametos (Litz, 1993).

La producción de embriones somáticos a partir de células, tejidos y cultivo de órganos puede ocurrir directa o indirectamente. El método directo involucra la formación de un embrión asexual a partir de una célula individual o un grupo de células de una parte del tejido del explante, sin pasar por la fase de callo (tejido nuclear de cultivares cítricos poliembriónicos). En el método indirecto se utiliza un estado intermedio de desarrollo de callo o un cultivo de suspensión de células durante el cual se induce un cambio en la potencialidad de las células mediante el uso de auxinas, que posteriormente se retiran y se induce la formación de embriones (Hartmann y Kester, 1998).

Por embriogénesis somática, originada directamente en explantes de nucelas o de callos, se han regenerado cultivares poliembriónicos y monoembriónicos de *Citrus* y de mango (*Mangifera indica*) y especies monoembriónicas de manzana (*Malus domestica*), *Ribes rubrum* y *Vitis vinífera* (Dodds y Roberts., 1982).

### **7.13 Organogénesis in vitro**

La organogénesis *in vitro* puede suceder directamente de yemas axilares preexistentes o bien de *novo* dando lugar a la formación de estructuras adventicias (brotes o raíces) a partir de tejido ya diferenciado no meristemático. La obtención de estos brotes puede ser de manera directa o indirecta. En la primera se pueden formar brotes en el explante, sin la formación de callo. La segunda se refiere a la inducción de callos a partir de los cuales se forman brotes y raíces. La organogénesis *in vitro* ha sido ampliamente usada en la biotecnología vegetal tanto para la micropropagación, transformación genética y estudios del desarrollo vegetal (Zhang y Lemaux, 2004).

La organogénesis *in vitro* depende de la aplicación exógena de hormonas, en particular auxinas y citocininas y también de la habilidad del tejido para responder a los estímulos hormonales durante el cultivo (Zhang y Lemaux, 2004).

En general, se reconocen tres fases para que se lleve a cabo la organogénesis; en la primera, las células del explante adquieren la competencia. En la segunda, las células competentes son canalizadas y determinadas para la formación de un órgano específico bajo la influencia de hormonas vegetales, y en la tercera, la morfogénesis continúa independientemente del suministro de fitohormonas (Sugiyama, 2000).

Está plenamente comprobado que ocurren modificaciones genéticas en las células y los tejidos cultivados *in vitro*. Muchas de estas modificaciones se manifiestan como mutaciones heredables a las progenies de las plantas regeneradas. Este fenómeno se conoce como variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981).

### **7.14 Variación Somaclonal**

El mejoramiento genético a escala celular *in vitro* ofrece ventajas importantes, como la eliminación de los efectos del medio ambiente y la facilidad para manejar un gran número de individuos en un espacio reducido. Las células vegetales pueden ser modificadas genéticamente mediante diferentes metodologías y entre

ellas podemos enumerar: fusión de protoplastos, variación somaclonal (espontánea o inducida), producción de haploides y biobalística. Una vez que se produce la modificación genética es necesario seleccionar las células que expresen el carácter de interés, para luego llevarlas a desarrollarse en una planta completa mediante la embriogénesis somática (Sacristán, 1982).

La variación somaclonal es una respuesta de la planta al ambiente que le produce el cultivo in vitro, el cual engloba la percepción del estrés por parte del tejido, la señal interna, la activación de factores de transcripción en respuesta, la reprogramación genética y el cambio en las características de las proteínas y el metabolismo. Debido a que el cultivo de tejidos es un proceso no natural, la planta está de continuo expuesta a una combinación de factores que en lo habitual no tiene en el cultivo normal (Cassells *et. al.*, 2003).

Según Taji (2002) las alteraciones en la carga cromosómica de las plantas originadas a través de cultivo de tejidos, pueden deberse al reducido control sobre la mitosis, uso de reguladores de crecimiento y otros componentes del medio de cultivo, incluso las propias condiciones ambientales del cultivo así como la inestabilidad del genotipo.

Los cambios fenotípicos en las plantas micropropagadas, pueden ser a causa de una variación temporal que es reversible y transmitida de una generación a otra de células durante el cultivo in vitro, pero no por vía sexual, que pueden producirse en las plantas cambios estables pero no heredables. Estos cambios son llamados variación epigenética (George, 1993; Skirvin *et. al.*, 1994). Una diferencia importante entre la variación genética y la epigenética, es que la primera sucede al azar y con menor frecuencia que la segunda; además, que las mutaciones genéticas son estables y heredables. Las características producidas por variación epigenética pueden transmitirse de una manera estable por mitosis, pero raras veces por meiosis; y el nivel de inducción de características epigenéticas es

influida de manera directa por la presión de selección que se realice en las células (Skirvin *et. al.*, 1994).

### **7.15 Alteraciones genéticas producidas durante el cultivo de tejidos.**

La posibilidad de alteraciones a nivel del DNA puede deberse a consecuencia de diferentes estreses ambientales, dependiendo de la intensidad del estrés y del estado de diferenciación de las células serán los cambios genómicos que se produzcan. Entre las alteraciones genéticas se citan mutaciones puntuales, cambios en la estructura o el número de cromosomas y activación de elementos genéticos transponibles. Estos últimos causan reorganizaciones moleculares, no solo por su transposición, sino también porque generan amplificaciones y deleciones.

En el caso de un callo, la desdiferenciación que se produce durante la inducción del mismo provoca en las células una serie de procesos metabólicos que resultan en reordenamientos genómicos que podrían dar lugar a fenotipos alterados. Entre las alteraciones genéticas registradas durante el cultivo *in vitro* pueden citarse mutaciones génicas, cambios cromosómicos que involucren la estructura o el número de los cromosomas y activación de elementos genéticos transponibles (Kaeppeler y Phillips, 1993).

### **7.16 Agentes Mutágenos.**

Existen muchas sustancias con capacidad mutagénica, sin embargo los más utilizados con fines prácticos son los denominados supermutágenos, entre ellos varios agentes alquilantes y la azida sódica, que pueden aumentar varios cientos de veces las tasas de mutación espontánea.

En la actualidad, el mejoramiento genético mediante inducción de mutaciones utiliza básicamente dos tipos de agentes mutágenos: los químicos metanosulfonato de etilo (EMS), N-metil-N-nitrosourea (MNH), sulfato de dietilo (dES) etc. y los físicos (rayos x, rayos gamma, etc.). Los agentes mutágenos

químicos son numerosos y continuamente se están incrementando. Sin embargo, para los propósitos de mejoramiento en plantas cultivadas sólo algunos pocos son realmente útiles. La mayoría de ellos pertenecen al grupo de los agentes alquilantes, denominados así por incorporar grupos alquilo a las macromoléculas y dentro de ellos se pueden señalar los siguientes: EMS, dES y los compuestos nitrosos como MNH (Gutiérrez *et al.*, 2003).

Con respecto a los mutágenos químicos, el EMS ( $C_3H_8O_3S$ ) es un agente mutagénico de tipo alquilante que puede transferir radicales etilo a las bases nitrogenadas, especialmente a guaninas. La adición ocurre, en general, en el oxígeno 6 de esta base, dando lugar a la forma anormal O-6-etil-guanina. Durante la replicación, la DNA polimerasa no reconoce esta forma modificada de guanina e introduce timina como base complementaria en vez de citosina, su complementaria en el silvestre. De este modo, un par G:C acaba convirtiéndose, tras dos replications, en uno A:T, induciendo la aparición de dichas transiciones GC→AT con una tasa de  $10^{-4}$  a  $10^{-2}$  por gen (Griffiths, 1996).

El EMS es conocido por provocar mutaciones puntuales (Luan *et al.*, 2007), con efectos pleiotrópicos (que afecta a múltiples características del fenotipo), mostrando modificaciones en más de un carácter, quizás en parte porque dichas mutaciones ocurren en diferentes loci (posición fija en un cromosoma) (Basu *et al.*, 2008). Figura 6

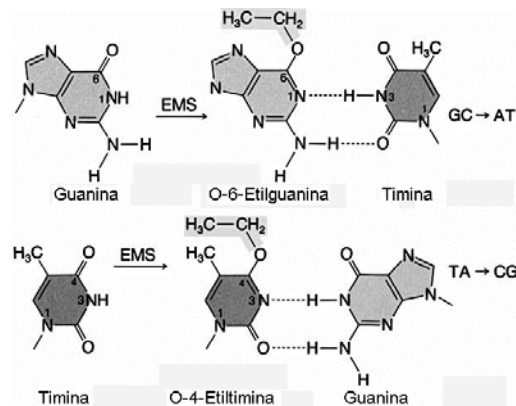


Figura 6. Acción del agente mutágeno EMS a nivel de DNA



### **7.17 Marcadores moleculares.**

Con objeto de evaluar la tasa de variación somaclonal en plantas regeneradas a partir del cultivo *in vitro* se emplean marcadores moleculares que permiten llevar a cabo análisis rápidos y objetivos. Las técnicas moleculares son una herramienta valiosa utilizada en el análisis de la estabilidad/inestabilidad genética de las plantas micropropagadas (Bairu *et al.*, 2011).

Diversas metodologías están disponibles para detectar variación genética entre las que se incluyen la identificación fenotípica y técnicas de análisis de DNA (Palombi *et al.*, 2007). Las técnicas para el estudio de la variabilidad del DNA, se basan en que cada organismo posee una secuencia característica de nucleótidos que componen su DNA, y la detección de estas diferencias por medio de marcadores moleculares permite identificar los individuos (Tonon *et al.*, 2002).

Los marcadores basados en DNA permiten estudiar el genoma con una amplia cobertura al incluir secuencias codificadoras y no-codificadoras del DNA (exones e intrones). Esto permite detectar con mayor eficiencia cambios genéticos puntuales, comparado con el análisis de las proteínas. Las principales ventajas radican en la presencia de un número ilimitado de ellos, que no son afectados por el medio ambiente, no presentan efectos pleiotrópicos y que pueden ser evaluados en cualquier etapa de desarrollo de la planta (Becerra y Paredes, 2000).

Algunas de estas regiones no codificantes, parecen estar involucradas en mantener la estructura del cromosoma, recombinación y/o control regulatorio. Estas regiones no codificantes, pueden acumular mutaciones más rápidamente que las codificantes, donde las mutaciones pueden afectar la supervivencia del organismo, y por lo tanto tienden a no ser transmitidas a la siguiente generación. Como estas mutaciones ocurren al azar, cada individuo lleva un set único de estas secuencias repetitivas (Tonon *et al.*, 2002).

Una serie de técnicas y marcadores han sido desarrollados para estimar la diversidad genética, (Cuadro 1) pero ninguna es universalmente ideal; cada

técnica tiene sus ventajas y desventajas. Por lo tanto, la elección de la técnica depende del investigador y de la resolución genética necesitada, así como también del presupuesto con que se cuenta y la experiencia técnica disponible (Mueller y Wolfenbarger, 1999).

Cuadro 1. Características de varios métodos de marcadores moleculares.

<b>CRITERIO</b>	<b>AFLP</b>	<b>RAPD</b>	<b>SSR</b>	<b>RFLP</b>
<b>Cantidad de información</b>	Alto	Alto	Alto	Bajo
<b>Reproducibilidad</b>	Alto	Variable	Alto	Alto
<b>Resolución</b>	Alto	Moderado	Alto	Alto
<b>Facilidad de uso</b>	Moderado	Fácil	Difícil	Difícil
<b>Tiempo</b>	Corto	Corto	Largo	Largo

(Mueller y Wolfenbarger, 1999).

Con el desarrollo de las tecnologías basadas en DNA, se han incorporado marcadores para detectar cambios en el genotipo de los individuos, aquellos basados en Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta última ha derivado en múltiples técnicas, dentro de las cuales las más utilizadas son RAPD y AFLP.

### **7.18 Polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP).**

Esta técnica está basada en la digestión del DNA total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Las enzimas tipo II son capaces de reducir la complejidad del DNA, como el de plantas, a una población de fragmentos de diferente tamaño (Becerra y Paredes, 2000).

Básicamente, los RFLPs son causados por rearrreglos del DNA, tales como pérdidas, inserciones o sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos, lo que significa la ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto es detectado a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción

del DNA genómico al hibridar con la sonda seleccionada (Becerra y Paredes, 2000).

La aplicación de esta técnica ha sido de gran utilidad en estudios filogenéticos, diversidad genética (Singla *et al.*, 2004) e identificación de cultivares con propósitos de protección varietal (Lombard *et al.*, 2000).

En la década de los 80s la forma principal de estudiar la variación genética era por medio de RFLP, pero todo eso ha cambiado con el desarrollo de la PCR.

### **7.19 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue concebida por Kary Mullis a mediados de los 80. El análisis PCR es un procedimiento *in vitro* para la síntesis y duplicación de secuencias específicas de DNA. Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis de fragmentos de DNA de longitudes variables, no mayores de 6 Kb en promedio (Valadez y Kahl, 2000).

El método imita el mismo proceso que las células utilizan para duplicar su DNA durante la división celular. La reacción básica de la PCR comienza con la desnaturalización del DNA molde para separar las cadenas, continúa con el alineamiento de un par de oligonucleótidos con su DNA molde, y termina con la polimerización para sintetizar un nuevo DNA entre los dos oligonucleótidos que flanquean la secuencia de interés. De aquí se vuelve a la desnaturalización para comenzar un nuevo ciclo.

### **7.20 Microsatélites (SSR).**

Consisten en secuencias de dos a seis nucleótidos que son repetidas varias veces en tandem y que muestran una alta variación en el número de repeticiones entre individuos. Con el desarrollo de oligos de PCR para las regiones que flanquean a los microsatélites, se puede medir la diversidad entre genotipos al detectar las variaciones alélicas de los microsatélites en este sitio. Los microsatélites son muy

atractivos para los genetistas pues combinan varias ventajas como son su codominancia, multialelismo y su alta heterocigosidad (Becerra y Paredes, 2000).

### **7.21 Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).**

AFLP es la más reciente clase de marcadores moleculares basados en PCR. La información es generada al combinar la digestión del DNA con enzimas de restricción, con amplificación por PCR. Con esta técnica se pueden generar un gran número de marcadores mediante la amplificación por PCR.

Los AFLPs presentan un alto poder de detección de variabilidad genética debido a que exploran simultáneamente la presencia o ausencia de sitios de restricción, como en los RFLPs, y la ocurrencia o no ocurrencia de amplificación, como en los RAPDs. Este marcador dominante es una herramienta mucho más poderosa que los RAPDs porque permite amplificar secuencias más largas de oligonucleótidos (lo que incrementa significativamente la especificidad), no requiere información previa de la secuencia del DNA (Picca *et al.*, 2004) y es altamente reproducible (Azofeifa, 2006).

Los AFLPs han sido utilizados para detectar variación somaclonal en plátano “Curare enano” (*Musa spp.*) *in vitro*. En este cultivo es frecuente la aparición de variación somaclonal durante la fase *in vitro*, por lo que es imprescindible este tipo de análisis (Sahjiram *et al.*, 2003). Además, los AFLPs han sido utilizados para estudios de variación somaclonal en *Arabidopsis thaliana* (Polanco y Ruiz, 2002), así como para detectar genes de resistencia a enfermedades en variantes somaclonales de papa (*Solanum tuberosum*) (Solomon y Barker, 2001).

### **7.22 Fragmentos polimórficos de DNA amplificados al azar (RAPD).**

La técnica RAPD consiste en el empleo de cebadores decaméricos arbitrarios, permitiendo la amplificación de secuencias de DNA a lo largo de todo el genoma. Esta metodología puede detectar, a través de un procedimiento relativamente sencillo, polimorfismos genéticos (Lu *et al.*, 2007).

Durante el análisis RAPD se dan una serie de reacciones químicas en forma cíclica de manera similar a lo que ocurre en una reacción PCR. La eficiencia de los marcadores RAPDs puede estar influenciada por varios factores, entre ellos: El número de ciclos de amplificación, la cantidad de DNA inicial, la longitud del DNA, el iniciador y la temperatura (Phillips *et al.*, 1995)

La eficiencia de los RAPDs como herramienta en la diferenciación de genotipos ha sido establecida ampliamente (Martin *et al.*, 2006). Estos marcadores han sido empleados con éxito en la detección de variantes somaclonales obtenidas por cultivo *in vitro*, y mutantes obtenidos mediante la aplicación de mutágenos químicos y físicos (Raimondi *et al.*, 2001; Gesteira *et al.*, 2002; Polanco and Ruiz, 2002; Nayak *et al.*, 2003; Atak *et al.*, 2004; Bennici *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2004; Gagliardi *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2007a; Prado *et al.*, 2007).

### **7.23 Estudios sobre la aplicación de EMS en diversos cultivos.**

En caña de azúcar se han obtenido variaciones somaclonales resistentes a *Fusarium sacchari* exponiendo los callos embriogénicos al mutágeno químico metanosulfonato de etilo (EMS). Las plantas tolerantes y resistentes a *F. sacchari* se obtuvieron mediante el tratamiento de callos con 32 mM EMS durante 4 h, exponiéndolos a 100 ppm de cultivo filtrado de *F. sacchari* en la fase de germinación de embriones. Esta tolerancia de las plantas se confirmó en ensayos de invernadero por inoculación con *F. sacchari* (Mahlanza *et al.*, 2013).

Se han reportado mutaciones inducidas de camote (*Ipomoea batatas* L.) tolerantes a salinidad, utilizando metanosulfonato de etilo (EMS). A partir de callos de explantes de hojas los cuales se trataron con 0,5% EMS para 0, 1, 1,5, 2, 2,5 y 3 h y 200 mM de NaCl. Los resultados sugirieron que los mutantes son más tolerantes a sal que las plantas control (Luan *et al.*, 2007).

En líneas de plátano de Brasil (*Musa* spp., AAA) se combinó el sistema de microsección transversal con la mutagénesis *in vitro* inducida por metanosulfonato de etilo (EMS) para detectar las plantas resistentes al marchitamiento por *Fusarium*.

Los resultados indicaron que la concentración óptima de EMS y la duración para el tratamiento de micro-secciones transversales fueron 300 mM y 60 min, respectivamente (Chen *et al.*, 2013).

En Limón Rough (*Citrus jambhiri* Lush.) se realizó un estudio para inducir tolerancia a salinidad. Se llevaron a cabo mutaciones por métodos físicos (rayos gamma) y por métodos químicos exposición con metanosulfonato de etilo y metanosulfonato de metilo (EMS y MMS). Para la mutagénesis física, se utilizaron callos de 40 y 60 días de edad, estos fueron irradiados con rayos gamma (0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 Gy). La mutagénesis química se llevó a cabo en callos de 45 y 60 días de edad, fueron expuestos con los mutágenos (EMS y MMS) a diferentes concentraciones (0,1, 0,2, 0,3 y 0,4%). Basándose en la supervivencia y el potencial de regeneración, se observó 10-20 y 20-30 Gy como las dosis óptimas de los rayos gamma en los callos de 40 y 60 días de edad, respectivamente. Para la mutagénesis química, la dosis más adecuada para callos de 45 días de edad fue de (EMS y MMS) fue de 0,1% cada uno, mientras que los callos de 60 días de edad no presentó ninguna regeneración después del tratamiento con mutágenos. Para la selección *in vitro* de mutantes y somaclones contra el estrés salino, se utilizó NaCl como agente selectivo a diferentes concentraciones (0, 25, 50, 75, y 100 mM) se mantuvo en este medio por 170 días. Se obtuvieron somaclonales tolerantes a sal en el intervalo de 25-100mM (Kumar *et al.*, 2010).

En cultivares de *Asteracantha longifolia* L., explantes de hojas fueron tratadas con EMS y se sembraron en medio MS, adicionado con BA (8.8  $\mu$ M) y NAA (2.69  $\mu$ M). Obteniéndose un total de 24 mutantes, 4 mutantes enanos, 7 mutantes de hojas, y 13 mutantes de flores, se analizaron morfológicamente, revelando una variación significativamente en la altura de la planta (18.6 a 42.3 cm), el número de inflorescencia de (4 a 10), en el color de la flor de blanco a violeta, y contenido en fitosteroles (0,033 a 0,0467 mg / g). Los análisis moleculares se llevaron a cabo mediante análisis RAPD, se utilizaron 30 cebadores generaron 185 productos

amplificados, de los cuales, 86 (46.73%) fueron polimórficos en la naturaleza (Motilal et al., 2012)

## **8. Procedimiento y Descripción de las Actividades Realizadas.**

### **8.1 Capacitación.**

En las instalaciones del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Se recibió capacitación en el corte de las hojas, tratamiento de desinfección y siembra de meristemas en medio MS, con el manejo de *Agave americana* en los procesos de selección de especímenes, los cuales se encuentran en los invernaderos del ITTG.

Las siguientes pruebas se realizaron en el tecnológico de Tlajomulco, Jalisco con *Agave tequilana*.

### **8.2 Preparación de medios PDA**

Se utilizó medio PDA sin antibióticos, para sembrar cepas del cepario de la Institución; y medio con antibióticos para aislamiento de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*. Se esterilizó en autoclave a 15 lb, 121 °C por 20 min.

### **8.3 Aislamiento de hongos patógenos en *Agave tequilana* Weber var. Azul.**

Se seleccionaron plantas enfermas con síntomas de marchitez, clorosis y enrollamiento de hoja, se hicieron cortes del tallo (base de la hoja) y raíces para obtener los explantes. Los explantes se desinfectaron con una solución de alcohol, cloro y agua en una proporción de 1:1:8, por 2 minutos, y posteriormente se enjuagaron 2 veces con agua destilada estéril. Se sembraron los explantes de tallo y raíces en el medio PDA suplementado con 0.12 g/L de Estreptomicina y 0.25 g/L de cloranfenicol. Se incubaron las cajas a 28 °C por 5 días.

### **8.4 Identificación morfológica de Hongos Patógenos.**

Transcurridos 5 días en medio PDA, se evaluó el crecimiento fúngico, se tomó una pequeña porción del crecimiento para realizar montajes utilizando colorante azul

de algodón, para observar la morfología en el microscopio, según las características indicadas en el Cuadro 2.

Especie	Colonias	Fiálides de hifas aéreas	Conidios	Clamidosporas
<i>F. oxysporum</i>	algodonosas, blanquecinas con zonas de color púrpura pálido	cortas (< 14 µm long.), laterales, cilíndricas o en forma de botella	macroconidios usualmente de 4-5 septos, con extremos picudos; microconidios en masas mucosas	presentes
<i>F. solani</i>	lanosas, blanquecinas con zonas púrpura pálido, volviéndose pardo claro o rojizo	muy largas (< 40 µm long.), cilíndricas, a menudo con un conidio adherido en el ápice	macroconidios usualmente de 3 septos, con extremos romos; microconidios en masas mucosas	presentes
<i>F. verticillioides</i>	algodonosas o pulverulentas, micelio aéreo blanquecino, micelio sumergido de color violáceo	subuladas (< 32 µm long.)	macroconidios usualmente de 3-5 septos, con extremos picudos; microconidios en largas cadenas	ausentes

Cuadro 2. Diferencias morfológicas entre las especies de *Fusarium* (Pemán J, Calvo R. 2007)

### 8.5 Técnica de PCR para identificación de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* a partir de muestras de campo.

Para la extracción del DNA de la muestra se utilizó el Kit ZR Plant/Seed DNA MiniPrep™. Posteriormente para realizar las amplificaciones del DNA, mediante la técnica de PCR punto final, con las siguientes características: H<sub>2</sub>OMQ (5.275 µL), amortiguador de reacción (1.25 µL), MgCl<sub>2</sub> 30 mM (0.625 µL), dNTPs 10 mM (0.25 µL), ITS1 (1 µL), ITS4 (1 µL), FG9 fre (1 µL), G6rev (1 µL), Taq CLP 0.1 FG9 fre, 0.24 (1 µL), DNA (30 µL), para obtener una mezcla homogénea se centrifugo a 900 rpm por 10 seg. Las muestras se llevaron a un termociclador, las condiciones de amplificación fueron: 94 °C (2´) y 35 ciclos de [94 °C (1´), 60 °C (1´), 72 °C (1´05), 72 °C (6´), 4 °C (59.59´)] y finalmente se visualizaron por electroforesis.



### **8.6 Electroforesis.**

Se pesó 1.2% de agarosa, y se mezcla con colorante SYBR Safe DNA gel Stain al 50% con Buffer TAE 1X, se disuelve en el microondas (1min), se vierte en la cámara de electroforesis, esperar hasta que se gelifique y posteriormente cargar las muestras, las cuales se mezclan con el colorante Gel 6X. Las condiciones de voltaje fueron 100 volts por 50 min. y finalmente se observa en el transilluminator DR-190M.

### **8.7 Desinfección de Meristemos.**

Para la desinfección de los meristemos obtenidos en el Tecnológico de Tlajomulco, estos fueron sometidos en el laboratorio de tejido vegetal en el Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez a un proceso de desinfección dentro de la Campana de Flujo Laminar la cual es desinfectada con benzaldehído y alcohol para posteriormente encender la luz UV por 20 minutos, y así trabajar los meristemos *in vitro* en condiciones asépticas, estos son sumergidos en las siguientes soluciones dando inicio con Agrimicin al 0.5%(M/V) y Captan 0.5%(M/V) por 20 minutos, la muestra se enjuaga 3 veces con agua destilada estéril para eliminarle el exceso de agrimicin y captan posteriormente con una solución de etanol al 70% (V/V) por 5 minutos se escurre, se le agrega una solución de cloro al 40%(V/V) por 20 minutos, se enjuaga dos veces con agua destilada estéril y se decanta, posteriormente se le adiciona una solución de cloro al 10%(V/V) por 10 minutos y se enjuaga tres veces con agua destilada estéril, después de decantar se le adiciona una solución de Cloruro de Mercurio al 0.1% por 10 minutos y se enjuaga 3 veces con agua destilada estéril para finalizar los meristemos son lavados con Hipoclorito de Calcio al 3%(M/V) por 20 minutos y se enjuagan 3 veces con agua destilada estéril, después de este proceso de desinfección los meristemos son aptos para sembrarse en el medio de cultivo MS.

### 8.8 Medio MS (Murashige y Skoog) Sin Regulador.

Para inocular meristemos desinfectados para la ambientación in vitro Cuadro 3

Cuadro 3. Medio MS sin regulador

<b>Sales MS</b>	4.3g/L
<b>Sacarosa</b>	30g/L
<b>Mionositol</b>	100mg/L
<b>Fosfato de Sodio</b>	50mg/L
<b>Vitaminas</b>	10ml/L
<b>pH</b>	5.7 ± 0.1
<b>Phytogel</b>	2.5g/L

Esterilizar a 15 libras por 15 minutos (Cañas M, 1993)

### 8.9 Medio MS (Murashige y Skoog) Con Regulador 0.5mg/L.

Para inocular meristemos desinfectados, y promover el desarrollo de callos in vitro

Cuadro 4

Cuadro 4. Medio MS con regulador 0.5mg/L

<b>Sales MS</b>	4.3g/L
<b>Sacarosa</b>	30g/L
<b>Mionositol</b>	100mg/L
<b>Fosfato de Sodio</b>	50mg/L
<b>Vitaminas</b>	10ml/L
<b>pH</b>	5.7 ± 0.1
<b>Phytogel</b>	2.5g/L
<b>2,4 D</b>	0.5mg/L

Esterilizar a 15 libras por 15 minutos

### 8.10 Medio MS (Murashige y Skoog) Con Regulador 5mg/L.

Para inducir el aumento de masa de callos in vitro Cuadro 5

Cuadro 5. Medio MS con regulador para inducir el aumento de masa de callos

<b>Sales MS</b>	4.3g/L
<b>Sacarosa</b>	30g/L
<b>Mionositol</b>	100mg/L
<b>Fosfato de Sodio</b>	50mg/L
<b>Vitaminas</b>	10ml/L
<b>pH</b>	5.7 ± 0.1
<b>Phytogel</b>	2.5g/L
<b>2,4 D</b>	5mg/L

Esterilizar a 15 libras por 15 minutos

Estas técnicas de medios MS fueron modificadas para la preparación de nuestros medios de la siguiente manera

### 8.11 Preparación de medio MS sin regulador

Se prepararon 200 mililitros de medio MS para la inoculación de los 8 explantes obtenidos de *Agave tequilana* weber variedad azul. En el Cuadro 5 se muestra las cantidades de cada reactivo.

Cuadro 6. Medio MS (200ml) sin regulador para la inoculación de 8 meristemos

<b>Sales MS</b>	0.86g
<b>Sacarosa</b>	6g
<b>Mionositol</b>	20mg
<b>Fosfato de Sodio</b>	10mg
<b>Vitaminas</b>	2ml
<b>pH</b>	5.7
<b>Phytogel</b>	0.5g

Se esteriliza en autoclave a 121°C, a 15lb/15min.

Para la desinfección se requirieron de 6 reactivos los cuales se muestran en el cuadro 7

Cuadro 7. Reactivos y proporciones necesarios para la primera desinfección de meristemos

<b>Agrimicin</b>	0.5g
<b>Captan</b>	0.5g
<b>Etanol</b>	70ml
<b>Cloro</b>	40ml
<b>Cloro</b>	10ml
<b>Cloruro de Mercurio</b>	0.1g
<b>Hipoclorito de Calcio</b>	3g (Se trituro posteriormente)

Se esterilizaron dos litros de agua destilada

Se realizó este procedimiento en dos ocasiones debido a que las muestras se contaminaron, como dos meristemos siguieron contaminados se procedió a una cuarta desinfección en la cual se modificó la técnica, se procedió a utilizar etanol al 70%(V/V) por 5 minutos, se decantó y se agregó una solución de cloro al

40%(V/V) por 10 minutos y se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril, después de esto se desinfectó con una solución de cloruro de mercurio al 0.1% por 5 minutos y se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril, para finalizar se agregó una solución de hipoclorito de calcio al 3%(M/V), por 5 minutos y se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril; posteriormente se inoculó un vez más en el medio MS sin regulador hasta observar ausencia de contaminantes.

Una vez que los 8 meristemas se encontraban en condiciones asépticas *in vitro*, se procedió a inocularlos en medio MS con reguladores.

Este se preparó de la siguiente forma, para 8 explantes se utilizaron de 200ml de medio MS con reguladores el cual fue modificado .Cuadro 8.

Cuadro 8. Medio MS (200ml) con reguladores para la inoculación de meristemas

<b>Sales MS</b>	0.86g
<b>Sacarosa</b>	6g
<b>Mionositol</b>	20mg
<b>Fosfato de Sodio</b>	10mg
<b>Vitaminas</b>	2ml
<b>pH</b>	5.7
<b>Phytogel</b>	0.5g
<b>2,4 D</b>	100µL

Se esterilizó en la autoclave a 121°C, a 15lb/15min.

### **8.12 Técnica de inoculación de Meristemas en Medio MS Sin Regulador.**

Como primer paso se procede a esterilizar las pinzas de disección, y cuadros de papel para utilizarlos como base para realizar cortes alrededor del meristemo. Después de la desinfección de los meristemas se realizaron algunos cortes para tener los meristemo lo más expuesto posible, para ser introducidos en los introducidos en los frascos con medio MS con las pinzas esterilizadas, aproximadamente a 10cm de la flama del mechero de alcohol para evitar cualquier contaminación del medio, este mismo procedimiento se repite con cada meristemo, se inocula en condiciones de 16horas de luz y 8 de oscuridad y se observa durante 7 días para asegurarnos que los meristemas no presenten contaminación.

Para las inoculaciones posteriores se mantiene las mismas condiciones de asepsia, una vez que los meristemas se encuentran en óptimas condiciones son trasplantados del medio sin regulador a un medio con reguladores.

El monitoreo del tamaño de las muestras se realiza cada semana

### 8.13 Desinfección y siembra de meristemas

Se realizó la primer siembra en la campana de flujo laminar la cual la podemos observar en la figura 7 así como el material de desinfección requerido.



Figura 7. Campana de Flujo laminar y material utilizado para la desinfección de meristemas.

A los dos días de siembra se observó contaminación en las 8 muestras, figuras 8,9



Figura 8. Muestras contaminadas, en la primera desinfección.

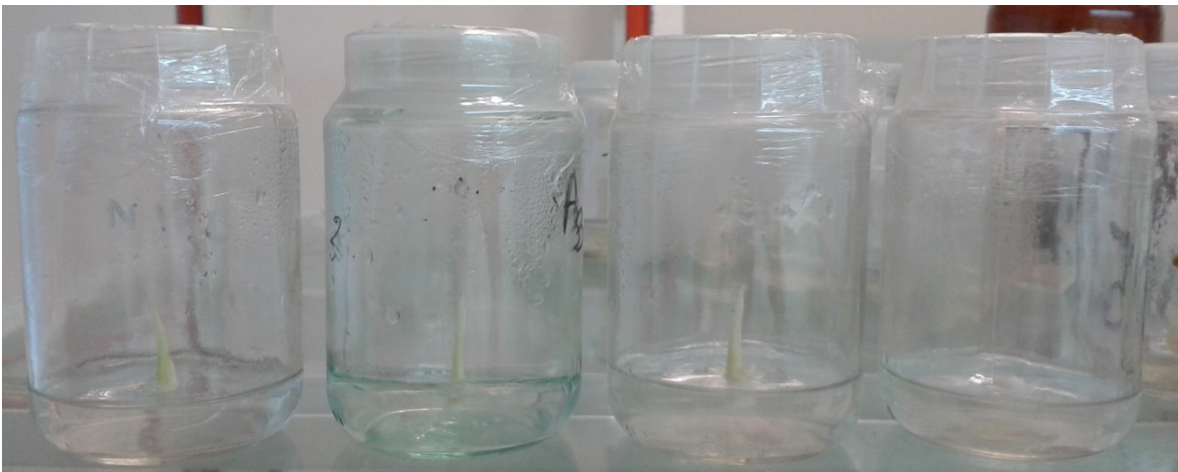


Figura 9. Muestras contaminadas, en la primera desinfección.

Al tercer día se realizó la segunda desinfección y resiembra de las mismas 8 muestras contaminadas, pero a los 4 días después de esto se observó contaminación en 6 de las muestras. Figura 10, por lo cual fueron desinfectadas por tercera ocasión.

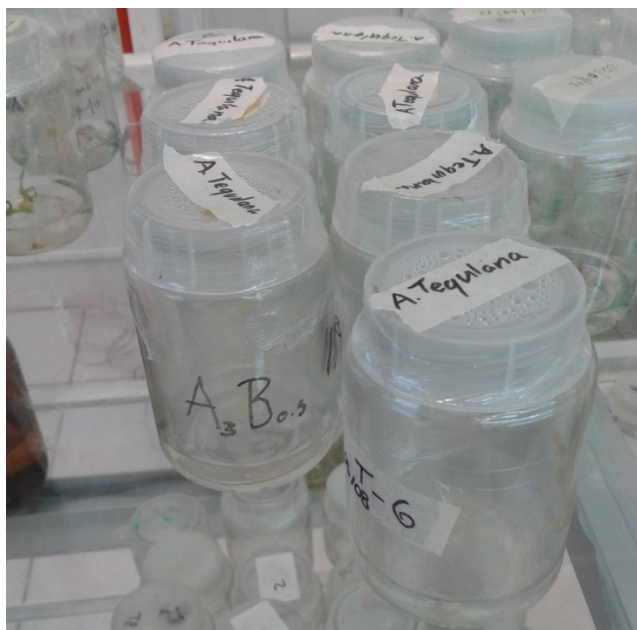


Figura 10. Frascos con muestras contaminadas por tercera ocasión

Las otras dos muestras restantes de la segunda desinfección y resiembra no presentaron contaminación después de 7 días. Figura 11a y 11b



Figura 11a



Figura 11b

Figura 11. Primeras muestras de meristemas asépticas inoculadas en medio MS sin regulador

A los dos días después de la tercera desinfección y resiembra de los 6 frascos contaminados se observó contaminación en dos de las muestras resembradas

Por lo que al tercer día se realizó la cuarta desinfección y resiembra de las dos muestras contaminadas. Figura 12a y 12b después de la resiembra.



Figura 12a

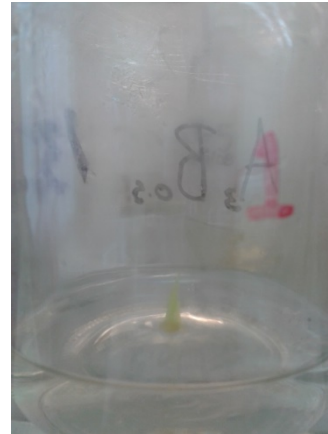


Figura 12b

Figura 12. Resiembra de meristemos contaminados por bacterias.

Los 8 explantes se observaron por una semana más y ya que no se presentó contaminación alguna se procedió a trasplantarse en medio MS suplementado con 2, 4 D, para la inducción de callos, para estas resiembras

Figura 13a y 13b.



Figura 13a.





Figura 13b.

Figura 13a y 13b. Meristemas trasplantados en medio MS con regulador

Posteriormente se monitorearon semanalmente para observar la formación de callos.

En la quinta semana se prepararon 150ml medio MS modificando la concentración de 2,4 D, de 0.5mg/L a 5mg/L(Cuadro 9), para el trasplante de los callos e inducir el aumento de la masa, para 7 explantes debido a que la cuarta muestra se contaminó y fue eliminada,

Cuadro 9. Medio MS (150ml) con regulador para inducir el aumento de masa de callos

<b>Sales MS</b>	0.86g/L
<b>Sacarosa</b>	6g/L
<b>Mionositol</b>	20mg/L
<b>Fosfato de Sodio</b>	10mg/L
<b>Vitaminas</b>	2ml/L
<b>pH</b>	5.7
<b>Phytogel</b>	0.5g/L
<b>2,4 D</b>	750µL

En la sexta semana se realizó el trasplante de los callos al nuevo medio MS con regulador, dentro de la campana de flujo laminar como se ve en la figura 14.



Figura 14. Trasplante de callos del medio MS con reguladores de una concentración de 0.5mg/L a 5mg/L de 2,4 D en campana de flujo laminar

### 9. Adición de Mutágeno.

Una vez que las plántulas han alcanzado los 30 días, se seleccionan las muestras mayores de 2cm de altura y con al menos 6mm de diámetro en la raíz y se sumergen en el Metanosulfanato de etilo a 0, 50, 100, 200, 300 o 400 mM por 30, 60 o 120 minutos, después son lavados con agua estéril y cortados en secciones de 1mm los cuales son posteriormente inoculados en medio MS suplementado (10 IM 6-benzylaminopurine (BAP), 10 IM IAA, 50 IM kinetin, 30 g L)1 sucrose, 10 g L)1 glucose and 0 - 65% agar (pH 5.8)) (Huang et al., 2001), después de 4 semanas de cultivo el porcentaje de supervivencia se determina con la siguiente formula:

$$\% \text{ de Supervivencia} = \frac{\text{Total de explantes sobrevivientes}}{\text{Total de explantes plantados}} \times 100$$

Nota: Esta etapa no se realizó por falta de masa callos suficientes para su realización.

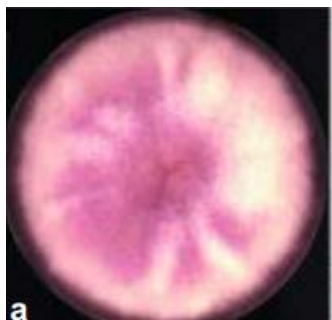


Figura 15. *Fusarium oxysporum* colonias sobre PDA a los 5 días de cultivo a 28°C.

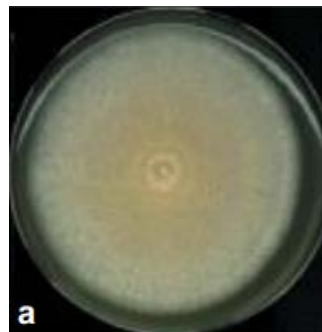


Figura 16. *Fusarium solani* colonias sobre PDA a los 5 días de cultivo a 28°C.

## 10. Resultados.

Se obtuvo la cepa aislada de *Fusarium oxysporum* (Figura 15) halladas en tallo y *Fusarium solani* (Figura 16) en raíces a partir de *Agaves tequilana* contaminados.

Mediante la realización de montajes utilizando colorante azul de algodón, se observó en microscopio las siguientes características morfológicas. Cuadro 10

Especie	Colonias	Fiálides de hifas aéreas	Conidios	Clamidosporas
<i>F. oxysporum</i>	Algodonosas, blanquecinas y purpura pálido	Cortas en forma de botella	Macroconidios septados (4-5 septos) con extremos picudos	Presentes

<b><i>F. solani</i></b>	Lanosa con un tono pardo claro	Largas y cilíndricas	Macroconidias con 3 septos y con extremos romosos	Presentes
-------------------------	--------------------------------	----------------------	---	-----------

Cuadro 10. Características morfológicas observadas al microscopio de *Fusarium oxysporum* presentes en tallo y *Fusarium solani* en raíces inoculadas en medio PDA a partir de *Agaves tequilana* contaminados.

En la tercera semana en medio MS con reguladores de se observó la primera formación de callos, en el frasco número 1. Figura 17.



Figura 17. Primera formación de callo en frasco núm. 1

A partir de la cuarta semana los resultados fueron monitoreados con fotografías y podemos ver el desarrollo de callos en las figuras 18 a, b, c, d, e, f, g y h.



Figura 18 a. desarrollo del callo del frasco. 1 en la 4ta semana

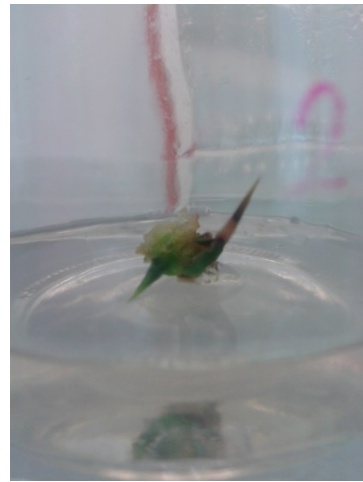


Figura 18b. Desarrollo del callo del frasco. 2 en la 4ta semana

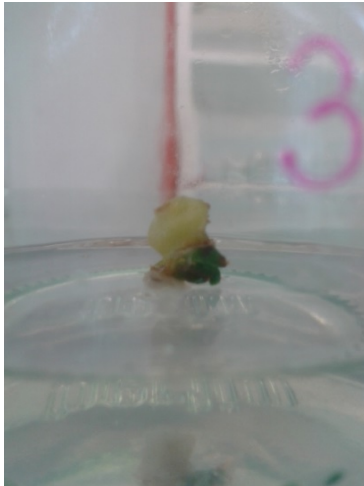


Figura 18c. Desarrollo de callo del Frasco 3 en la 4ta semana

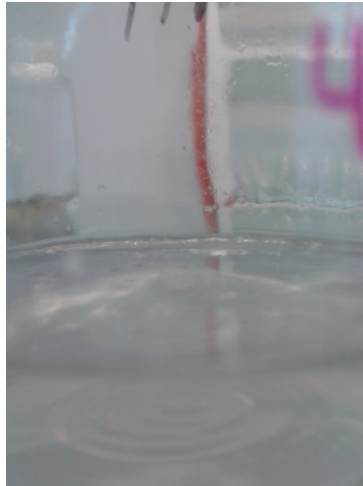


Figura 18d. Desarrollo de callo del Frasco 4 en la 4ta semana

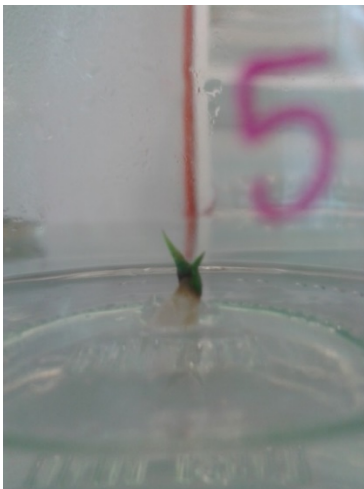


Figura 18e. Desarrollo de callo del Frasco 5 en la 4ta semana

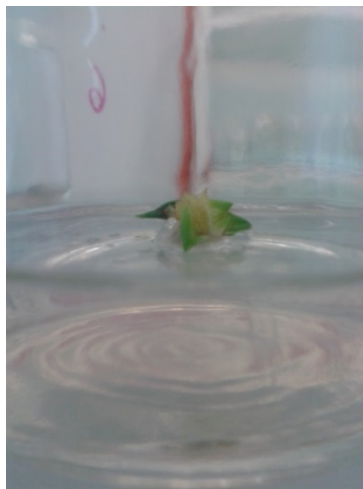


Figura 18f. Desarrollo de callo del Frasco. 6 en la 4ta semana



Figura 18g. Desarrollo de callo del Frasco 7 en la 4ta semana

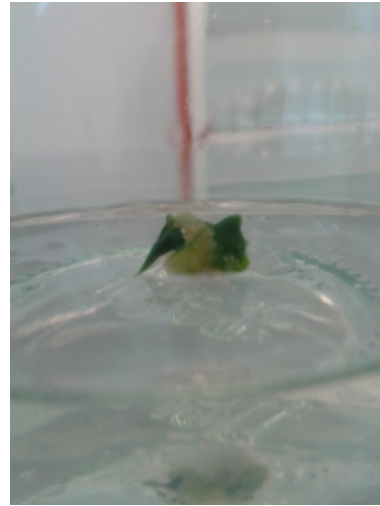


Figura 18h. Desarrollo de callo del Frasco 8 en la 4ta semana

Nota: El frasco con la muestra número 5 no presentó formación de callo.

Quinta y sexta semana de igual forma se monitorea con fotografías y podemos observar el avance en la formación de callos en las figura 19 a, b, c, d, e, f, g, h.



Figura 19a. Desarrollo de callo del Frasco 1 entre la 4 y 5ta semana



Figura 19b. Desarrollo de callo del Frasco. 2 entre la 4 y 5ta semana



Figura 19c. Desarrollo de callo del Frasco 3 entre la 4 y 5ta semana



Figura 19d. El medio se contaminó

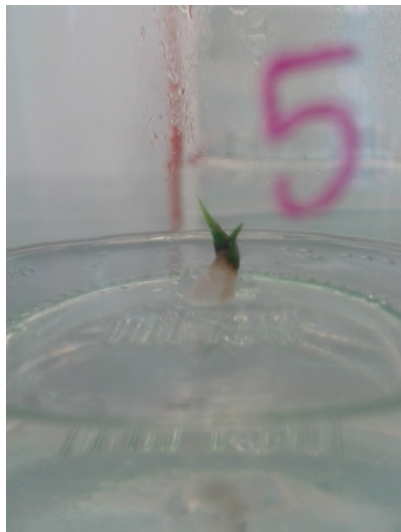


Figura 19d. Desarrollo de callo del Frasco 5 entre la 4 y 5ta semana

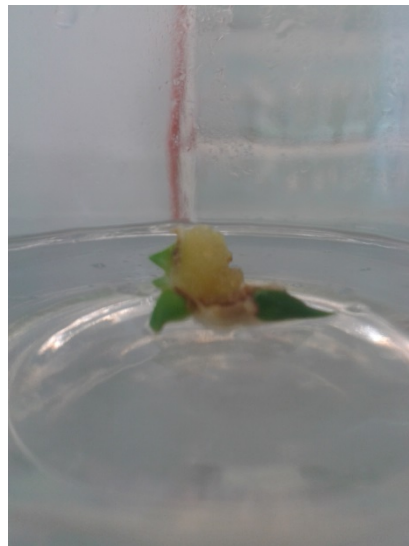


Figura 19e. Desarrollo de callo del Frasco 6 entre la 4 y 5ta semana

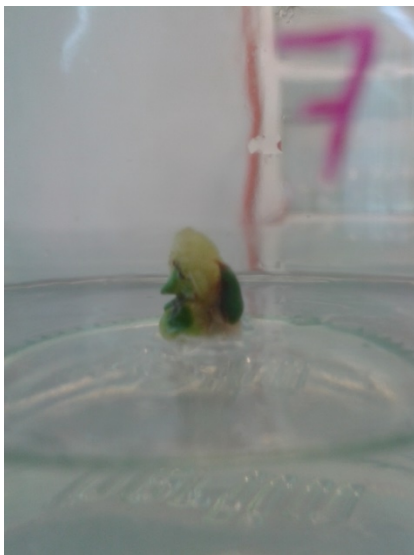


Figura 19f. Desarrollo de callo del Frasco 7 entre la 4 y 5ta semana

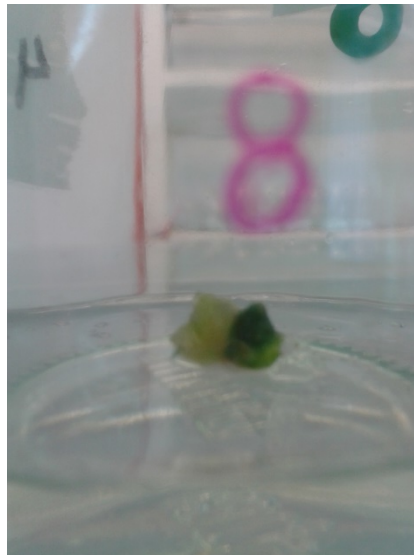


Figura 19g. Desarrollo de callo del Frasco 8 entre la 4 y 5ta semana

Observación: en el frasco 4 el medio de cultivo se contaminó por lo que la muestra fue eliminada.

En la sexta semana se realizó el trasplante de los callos del Medio Ms con regulador de una concentración de 0.5mg/L de 2,4 D a una de 5mg/L de 2,4 D.

En séptima semana se observó un crecimiento favorable en la masa de los callos. Figura 20, por la modificación del regulador.



Figura 20. aumento en la masa de callos del Frasco 1 en la 7ª semana



Figura 20. aumento en la masa de callos del Frasco 1 en la 7ª semana





Figura 20. aumento en la masa de callos del Frasco 3 en la 7ª semana



Figura 20. aumento en la masa de callos del Frasco 5 en la 7ª semana

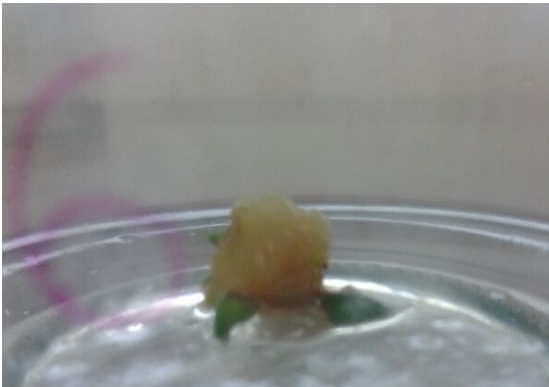


Figura 20. aumento en la masa de callos del Frasco 6 en la 7ª semana



Figura 20. aumento en la masa de callos del Frasco 7 en la 7ª semana



Figura 20. aumento en la masa de callos del Frasco 8 en la 7ª semana

Nota: esta masa de callos aun no es la suficiente para realizar la adición del agente mutagénico.

## **11. Conclusión.**

De acuerdo a los resultados que se han obtenido hasta el momento podemos concluir que el tiempo necesario para llevar a cabo la investigación completa es mucho mayor al que se le ha invertido actualmente, ya que la producción de masa de callos hasta este momento no ha sido suficiente para llegar a la aplicación del mutágeno, por que se requiere de mayor tiempo para generar la variante somaclonal resistente a *Fusarium oxysporum*. Sin embargo se logró la identificación y aislamiento de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, en Agave tequila contaminados, siendo estas las razones por las cuales no se han cumplido los objetivos de este proyecto en su totalidad, conociendo el valor de esta investigación para el mejoramiento de la resistencia de *A. tequilana* contra *Fusarium oxysporum*, se recomienda darle continuidad a la investigación ya que ésta tiene un gran campo de estudio a explorar.

## 12. Bibliografía.

Aceves, R. J. J. (2003). Prevención y manejo integral de la marchitez del Agave tequilana Weber var. Azul en Jalisco. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Campo experimental Altos de Jalisco. Folleto Técnico No. 1. 62 p.

Azofeifa DA (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17, 221–242.

Basu SK, Acharya SN y Thomas JE (2008). Genetic improvement of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) through EMS induced mutation breeding for higher seed yield under western Canada prairie conditions. *Euphytica*, 160, 249-258.

Becerra V, Paredes M y Romero O (2001). Diversidad bioquímica y molecular en frutillas chilenas (*fragaria chiloensis* L. Duch.) y su implicancia en el mejoramiento genético de la especie. *Agricultura Técnica*, 61, 413-428.

Cañas M. (1993). *METODOLOGÍAS IN VITRO DE VEGETALES*. Ediciones VIS. Bucaramanga-Colombia. pag: 50-54

Cassels AC, Croke JT y Doyle BM (1997). Evaluation of Image analysis, flow cytometry, and RAPD analysis for the assessment of somaclonal variation and induced mutation in tissue culture-derived *Pelargonium* plants. *Angewandte Botanik*, 71, 125-130.

Cedeño, M.C., (1995). Tequila production. *Critical Reviews in Biotechnology* 15, 1–11.

Consejo Regulador del Tequila, (2006). Estadísticas del CRT. <http://www.crt.org.mx>, Cited 12 July 2006.

Dodds JH y Roberts LW (1982). *Experiments in Plant Tissue Culture*. (pp. 178) Cambridge: Cambridge University Press.

Flores L., H. E., J. A. Ruiz C., R. A. Martínez P., D. R. González E. y L. Nava V. (2003). Determinación del potencial productivo de especies vegetales para el estado de Jalisco: Distrito de Desarrollo Rural 066 Lagos de Moreno. Folleto Técnico Núm. 2. INIFAP-CIRPAC-C.E. Altos de Jalisco. Tepatitlán, Jal. México. 54 p.

Fucikovský, Z. L. (2004). *Agave tequilana* Weber var. Azul y sus principales problemas fitosanitarios. pp 148-159. In: *Avances de la investigación en el agave tequilero*.

Gentry, H.S. (1982). *Agaves of Continental North America*. Tucson, AZ: University of Arizona Press. 670 pp.

George EF (1993). *Plant propagation by tissue culture. Part 1. The Technology*, pp. 574. England: Exegetics, Limited.

Griffiths JF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC y Gelbart WM (1996). *An Introduction to Genetic Analysis* (6 Ed.). New York.: W. H. Freeman & Company.

Gutiérrez A, Santacruz F, Cabrera J y Rodríguez B (2003). *Mejoramiento genético vegetal in Vitro*. (vols. 1 (1), 1-19), México: e-Gnosis.

Hartmann HT y DE Kester (1998). *Techniques of in vitro culture of micropropagation*. In: *Plant Regeneration Principles and Practices* H. Hartmann T.,D. Kester. (6th ed., pp: 549-608). Prentice Hall New Hersey.

Hoffmann NE, Raja R, Nelson RL, Korban SS (2004). *Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers*. *Biology Plantarum*, 48:173–177.

Huang X, Huang XL, Wang HH, Li XJ, 2001. *Studies on the plant regeneration from the micro-cross sections of banana*. *Acta Horticulturae Sinica* 28, 19–24.

Kaeppler SM y Phillips RL (1993). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 29, 125-130.

Larkin PJ y Scowcroft WR (1981). *Somaclonal variation: A novel source of variability from cell culture for plant improvement*. *Theoretical Applied Genetics*, 60,197-214.

Litz RR (1993). *Organogenesis and somatic embryogenesis*. *Acta Horticulture*, 336, 199-205

Lombard V, Barilb CP, Dubreuilb P, Blouetb F, Zhanga D, Geves A, Du y Magneraud D (2000). *Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP, consequences for varietal registration*. *Crop Science*, 40, 1417-1425

Luan YS, Zhang J, Gao XR y An LJ (2007). *Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), in vitro screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.)*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 88, 77-81.

Luna, H. G. (1996). Pudrición del tallo de Agave tequilana L. Weber en el Estado de Jalisco, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. 58 p

Mahlanza T, Rutherford RS, Snyman SJ y Watt MP (2013). In vitro generation of somaclonal variant plants of sugarcane for tolerance to *Fusarium sacchari*. *Plant Cell Reports*, 32, 249–262

Martínez, R. J. L., Vázquez, G. M., Pimienta, B. E., Bernal, M. F., Flores, M. F., Ibarra, D. R., Torres, M. P., Cuevas, C. H., Martín del Campo, M. N., Rodríguez, R. R. y Virgen, C. G. (1998). Proyecto: Epidemiología y manejo integrado de problemas fitosanitarios en Agave tequilana Weber var. Azul. *Rev. Mex. Fitopatol.* 16 (1): 116.

Mueller UG y Wolfenbarger LL (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 389-394.

Nobel, P. S. (1988). *Environmental Biology of Agave and Cacti*. Cambridge University Press, New York, 270p.

Nobel, P.S. (1994). *Remarkable Agaves and Cacti*. New York: Oxford University Press. 166 pp.

Pemán J, Calvo R. (2007). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica, Cap. 13, Identificación de otros hongos miceliares, *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao, 12 p

Pimienta B., E., J. Zañudo, E. Yopez, E., and P.S. Nobel. (2000). Seasonal variation of net CO<sub>2</sub> uptake for cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) and pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) in a semiarid environment. *Journal of Arid Environments* 44: 73-83.

Rodríguez-Garay B.(2004) La materia prima Agave tequilana weber var. Azul. Consejo Regulador del Tequila. México.

Rodríguez-Garay, B., Lomelí-Sención, J.A., Tapia-Campos, E., Gutiérrez-Mora, A., García-Galindo, J., Rodríguez-Domínguez, J.M., Urbina-López, D., Vicente-Ramírez, I., (2009). Morphological and molecular diversity of Agave tequilana Weber var. Azul and Agave angustifolia Haw. var. Linenõ. *Ind. Crops Prod.* 29, 220–228.

Ruiz C., J. A., G. Medina, I. J. González, C. Ortiz, H. E. Flores L., R. A. Martínez y K. F. Byerly. (1999). Requerimientos agroecológicos de cultivos. Libro Técnico Núm. 3. INIFAP-CIRPAC. Ed. Conexión Gráfica. Guadalajara, Jalisco, México. 362 p.

- Ruiz C., J. A., G. Medina, I. J. González, C. Ortiz, H. E. Flores L., R. A. Martínez y Ruiz C., J. A., I. J. González A., J. R. Regalado R., J. Anguiano C., I. Vizcaíno V. y D. R. González E. (2003)a. Recursos edafo-climáticos para la planeación del sector productivo en el Estado de Jalisco. Libro Técnico Núm. 2. INIFAPCIRPAC. Ed. Conexión Gráfica. Guadalajara, Jalisco. 172 p.
- Ruvalcaba RD, Santacruz RF y GB Rodríguez (2000). Estudios citogenéticos en Agave tequilana Weber variedad azul. En: XVIII Congreso Nacional de Fitogenética. Irapuato, Guanajuato, México. pp. 157
- Skirvin RM, McPheeters KD y Norton M (1994). Sources and Frequency of Somaclonal Variation. HortScience, 29 (11), 1232–1237.
- Sugiyama M (2000). Genetic analysis of plant morphogenesis in vitro. International Review of Cytology, 196, 67-4.
- Tonon A, Ruiz M y Otegui M (2002). Utilidad de los marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies forestales. Novenas Jornadas Técnicas Forestales, Eldorado, Misiones, Argentina.
- Valenzuela ZA (1994). El agave tequilero: su cultivo e industrialización. Ed. Ágata. México. 119 p.
- Vargas T., V. M. (2004). Evaluación del potencial agroecológico del cultivo de Agave tequilana Weber en el Estado de Jalisco. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara, Facultad de Agronomía. Zapopan, Jalisco. 46 p.
- Zhang S y Lemaux PG. (2004). Molecular analysis of in vitro shoot organogenesis. Critical Reviews Plant Sciences, 23, 325-335.