



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico Nacional de México
Campus Tuxtla Gutiérrez

INFORME TÉCNICO DE RESIDENCIA PROFESIONAL

Titulo:

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE INDUCCIÓN DE
CALLO DE *Agave americana* L. PARA LA OBTENCIÓN DE
UNA LÍNEA CELULAR**

PRESENTA

LUIS FERNANDO ROJAS CABRERA

14270428

ASESOR:

DRA. NANCY RUIZ LAU

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a la Dra. Nancy Ruíz Lau, por su ayuda y asesoramiento. La generosidad y amabilidad demostrada en cada momento, han sido de gran apoyo durante el periodo de realización de éste proyecto.

Agradecer a Arnoldo Enrique Alfaro Corres por la paciencia y disponibilidad que ha tenido en todo momento.

Al Dr. Federico Antonio Gutiérrez Miceli por permitirme trabajar en su laboratorio, y a mis compañeros del Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales no solo por la apreciable ayuda que brindaron si no por ese sincero compañerismo que hace que el día sea más grato y llevadero.

Agradezco principalmente a mis padres, por el apoyo y constante motivación en todo momento.

RESUMEN

Agave americana L. es una planta que tiene una gran importancia económica y cultural en México, en numerosos pueblos indígenas los han aprovechado durante siglos como fuente de alimentos, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras, abono, entre otros usos, no únicamente de ésta especie, si no de la mayoría de las especies de Agave, lo que ha despertado un gran interés para adentrarnos a las investigaciones a nivel celular. Este proyecto tuvo como objetivos: determinar el explante y fitohormona óptima para la formación de callos, así como establecer suspensiones celulares a partir de callos friables. Para ellos se llevó a cabo la inducción de formación de callos a partir de diferentes secciones (base, media y apical) del meristemo y diferentes concentraciones de las fitohormonas ácido naftalenacético (ANA) en combinación con bencilaminopurina (BAP) y ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D) (0.25, 0.5 y 0.75 mg L⁻¹), utilizando el medio de cultivo (MS) semisólido. Los mejores resultados se obtuvieron en la formación de callo tomando como explante las secciones medias del meristemo, utilizando la fitohormona auxina 2,4-D a concentración de 0.5 mg L⁻¹ obteniendo 75% de callos, siendo la combinación de fitohormonas ANA+BAP a 0.5 mg L⁻¹ la que mejor reacciono con el explante para la formación de callo los cuales tuvieron las características adecuadas para ser disgregadas. Una vez obtenidos los callos, se prosiguió a establecer la suspensión celular utilizando las mismas concentraciones de fitohormonas, y medio (MS) líquido, los resultados fueron favorables en cuando al establecimiento celular utilizando las fitohormonas ANA+BA a concentración 0.5 mg L⁻¹, sin embargo la generación de biomasa fue lenta.

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
I. INTRODUCCIÓN	6
II. JUSTIFICACIÓN	8
III. OBJETIVOS	10
3.1. Objetivo General	10
3.2. Objetivos Específicos.....	10
IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPO.	11
V. PROBLEMAS A RESOLVER	11
VI. ALCANCES Y LIMITACIONES	11
VII. FUNDAMENTO TEÓRICO	12
7.1. AGAVE.....	12
7.1.1. TAXONOMÍA DE LA PLANTA DE AGAVE	12
7.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN DEL AGAVE AMERICANA.	13
7.3. MICROPROPAGACIÓN (CULTIVO <i>IN VITRO</i>).....	18
7.4. EXPLANTE.....	20
7.5. INDUCCIÓN DE CALLOS	21
7.6. SUSPENSIÓN CELULAR.....	23
7.7. HORMONAS DE CRECIMIENTO VEGETAL.....	25
7.7.2. EL BALANCE HORMONAL EN LAS PLANTAS.....	26
7.7.3. LAS AUXINAS Y SU PAPEL EN LAS PLANTAS	26
7.7.4. LAS CITOCININAS Y SU PAPEL EN LAS PLANTAS	29
VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.....	31
IX. RESULTADOS	34
X. CONCLUSIÓN.....	40
XI. RECOMENDACIONES	41
XII. COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS	42
XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	43
XIV. ANEXO (ACTIVIDAD EXTRA).....	45
Efecto del polietilenglicol (PEG) sobre células en suspensión de <i>Agave americana</i> L.....	45
Planta <i>ex vitro</i> de <i>Agave americana</i> bajo riego restringido.....	45
RESULTADOS	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Variedades de plantas del genero Agave.....	13
Figura 2. Planta Agave americana L.....	13
Figura 3. Plantas de Agave americana L., de la región de Comitán, Chiapas.....	16
Figura 4. Ubicación de plantaciones de Agave americana Y Agave Salmiana en la Meseta Comiteca de Chiapas.....	17
Figura 5. Micropropagación de Agave americana L.....	20
Figura 6. Explantes de Agave americana utilizadas para micropropagación.....	21
Figura 7. Formación de callo a nivel in vitro.....	22
Figura 8. Tipos de Hormonas vegetales.....	25
Figura 9. Eventos fisiológicos en los que actúan las hormonas vegetales.....	26
Figura 10. Auxinas. A) Auxinas naturales. B) Auxinas producidas por síntesis química industrial.....	27
Figura 11. Citocininas. A) Citocininas naturales. B) Citocinina producida por síntesis química.....	30
Figura 12. Respuestas del tipo de sección de explante a las concentraciones de fitorreguladores para el proceso de calogénesis. A) Oxidación en la base del meristemo en medio MS con 2,4-D (0.25 mg L ⁻¹) a las 6 semanas. B) Oxidación en parte media de meristemo en medio MS con 2,4-D (0.25 mg L ⁻¹). C) Base de meristemo en medio MS con 2,4-D (0.75 mg L ⁻¹). D) Meristemo en medio MS adicionado con ANA+BA (0.5 mg L ⁻¹)....	34
Figura 13. Formación de embriones de Meristemo en medio MS líquido adicionado con 2,4-D (0.5 mg L ⁻¹).	37
Figura 14. Formación de suspensión celular de Meristemo en medio MS líquido adicionado con ANA+BAP. A) Día cero de suspensión celular. B) Semana uno de suspensión celular. C) Semana cuatro de suspensión celular.	38
Figura 15. Células viables en el medio de cultivo líquido con ANA+BA. A) oscurecimiento de callo a partir de los 21 días. B) Células no teñidas por el colorante azul tripán después de seis semanas.....	39
Figura 16. Peso fresco. A) Células testigo. B) Células PEG 15%. C) Células PEG 30%. 46	
Figura 17. Células en suspensión de A. americana L. A) Células Testigo antes de someter a tratamiento. B) Células antes de someter a tratamiento con PEG 15%. C) Células antes de someter a tratamiento con PEG 30%. D) Células Testigo a los 28 días. E) Células con tratamiento PEG 15% a los 28 días. F) Células con tratamiento PEG 30% a los 28 días.	47
Figura 18. Tratamientos. A) Testigo B) Estrés.....	49

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de Agave americana L.....	14
Cuadro 2. Soluciones para preparación de medio MS.....	32
Cuadro 3. Porcentaje de formación de callo en meristemo.....	35
Cuadro 4. Características de color y textura de los callos presentes en meristemos.....	36
Cuadro 5. Peso inicial y peso fresco de cada tratamiento.....	46
Cuadro 6. Peso fresco y peso seco de parte aérea y raíz de Agave americana.....	48
Cuadro 7. Longitud de parte aérea y raíz de Agave americana en tratamiento.....	49
Cuadro 8. Cantidad de clorofila en Agave americana en tratamiento.....	50

I. INTRODUCCIÓN

Agave americana L. (Maguey) es una planta originaria del centro y este de México que fue introducida en Europa, a través de España, en el siglo XVI, por los conquistadores del nuevo mundo, primero como planta ornamental y después como planta textil. Se comporta como invasora y puede colonizar muchos hábitats diferentes como acantilados, bosques del litoral o del interior, campos de cultivo y zonas alteradas (Santiago et al. 2013).

Estas plantas satisfacen varias necesidades de los pobladores de las zonas áridas y semiáridas del país, incluso llegan a ser el soporte de importantes actividades económicas generadoras de riquezas como lo son la industria tequilera, mezcalera y de fibras naturales. Actualmente, los tallos (piñas), el aguamiel obtenido de la piña, quiotes (inflorescencias inmaduras), bases de las hojas y flores son aún parte de la dieta en muchas regiones del país, mientras que las hojas se usan como forraje para el ganado (Santiago et al. 2013).

Los agaves son de crucial importancia para nuestro país. A pesar de lo anterior, se han hecho relativamente pocos esfuerzos para estudiarlos, mejorarlos y conservarlos. La mayoría de los trabajos en este sentido se han realizado con aquellas especies ya consideradas como cultivadas, como las usadas para la producción de tequila, mezcal, aguamiel, pulque, fibras, etc. tal es el caso del *Agave americana* (Santiago et al. 2013).

Actualmente se han hecho estudios proponiendo técnicas de micro propagación o *in vitro* de *Agave*, misma que consiste en la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, con el fin de resolver problemas en cuanto a la reproducción sexual y asexual limitadas por problemas de polinización y viabilidad de las semillas, lo que hace la difícil multiplicación masiva de los Agaves (Domínguez M. et al. 2008).

Lo más actual en aplicaciones de técnicas de cultivo de tejidos es el establecimiento de suspensión celular, que consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio en movimiento. Estas suspensiones se inician generalmente mediante incubación de trozos de callos friables obtenidos a partir de

técnicas *in vitro* con ayuda de fitohormonas. Dichas suspensiones pueden ser permanentes mediante el suministro continuo de nutrimentos (Szabados. et al. 1991).

En su iniciación, las suspensiones celulares constan de grandes agregados y células libres, alargadas y enormes, que no se dividen; conforme el medio se va agitando estos se van disgregando y después de repetir los subcultivos es factible obtener una suspensión celular finamente dispersa con alto ritmo de crecimiento (Szabados. et al. 1991).

Ésta técnica podría ser usada como alternativa para el mejoramiento genético del *Agave americana*. Lo más común en experimentación con las células es llevarlas a cualquier tipo de estrés ya sea hídrico, salino, bajas o altas temperaturas, lumínicas entre otras, con el fin de obtener algún metabolito de interés o simplemente para ver el comportamiento de éstas al someterlas a distintos factores para adaptabilidad.

II. JUSTIFICACIÓN

Agave americana es una planta de alto interés económico en México, dado que su principal uso es para la producción de productos comerciales (pulque, tequila, mezcal, entre otros) (García M. et al. 2007), también es utilizado como plantas de ornato, para uso terapéutico dentro de la medicina herbolaria, así como para forrajes para ganado.

El desarrollo de plantas capaces de tolerar cualquier tipo de estrés se ha convertido en una prioridad para la agricultura moderna. Siendo el agua uno de los factores más importantes para el desarrollo de las plantas, ya que su carencia constituye una de las principales fuentes de estrés. Muchas plantas han desarrollado evolutivamente respuestas o adaptaciones tanto a nivel morfológico como anatómico y celular, que les permiten tolerar diferentes niveles de déficit de agua.

De manera general *Agave americana* ha sido poco estudiado, y derivado al uso que se le ha dado a esta planta se ha despertado el interés para su investigación en cuanto a sus propiedades, por lo anterior se propone establecer una línea celular de *agave americana*; con la finalidad de tener un modelo celular que dé pie a futuras investigaciones, para que principalmente estas células sean sometidas a estrés o (hídrico, lumínico, variaciones de temperaturas, entre otros factores a evaluar) o bien para el estudio de los mecanismos de tolerancia para entender los procesos naturales de su adaptabilidad.

Aunque los cultivos celulares se han utilizado como una herramienta muy útil para entender los mecanismos de tolerancia que operan a nivel celular, también han sido utilizados ampliamente para estudiar otros procesos biológicos como: la fotosíntesis, el transporte de iones, la producción de metabolitos secundarios, estudios sobre el crecimiento así como la diferenciación celular y la muerte celular programada (Gómez et al. 2014).

Al tratarse de un modelo celular, dichas células pueden ser sometidas a diferentes condiciones de estrés ya sea para la obtención de los metabolitos secundarios causantes del efecto terapéutico, de igual forma hacer resistencia en las plantas no solo a condiciones de climas extremos, sino también hacerlas resistentes contra microorganismos fitopatógenos que afectan en su desarrollo; se podrán hacer modificaciones genéticas que permitan mayor y mejor productividad en cuanto al producto esperado de estas plantas (tequila o mezcal, que es lo que le compete a la industria tequilera).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Evaluar el efecto de auxinas y citocininas sobre la inducción de callo en *Agave americana* para establecimiento de una línea celular.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar la concentración de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido naftalenacético en combinación con bencilaminopurina (ANA+BAP) para la inducción de callos en el meristemo apical de *Agave americana*.
- Determinar el efecto de 2,4-D y ANA+BAP para la obtención de biomasa celular de *Agave americana*.

IV. CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA EN QUE PARTICIPO.

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio No. 12 del Polo Tecnológico y en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales ubicado en el edificio Z del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; bajo la dirección de la Dra. Nancy Ruiz Lau.

V. PROBLEMAS A RESOLVER

Debido a que no se han adentrado al estudio del Agave, éste proyecto propone establecer una línea celular de *Agave americana*, con el fin de obtener un modelo celular para futuras investigaciones, para llevarlas a cualquier tipo de estrés ya sea para obtener algún metabolito secundario de interés o bien para modificar genéticamente y hacerlos resistentes a distintos factores en los que puedan encontrarse.

VI. ALCANCES Y LIMITACIONES

Las limitaciones con las que nos enfrentamos al realizar el trabajo de investigación puesto a que intentamos hacer crecer callos a partir de tejidos de *Agave americana*, primero que nada fue el tiempo en el que se obtiene respuesta a nivel *in vitro* ya que el Agave no ha sido muy estudiado y por lo tanto es tardado obtener respuestas de generación de órganos, de acuerdo a esto se necesita saber que parte de la planta es la más adecuada, lo que se deduce al experimentar con el meristemo de la planta con las hormonas 2,4-D y ANA+BA a diferentes concentraciones para la obtención callos friables, es decir, callos con las características adecuadas para que puedan disgregarse en un medio líquido; y de igual forma para el medio líquido, al probar distintas concentraciones de dichas fitohormonas para obtener la concentración ideal para la generación de biomasa celular.

VII. FUNDAMENTO TEÓRICO

7.1. AGAVE

Los agaves son plantas perennes, rizomatosas, frecuentemente propagadas por hijuelos, con raíces duras y fibrosas; además cuentan con un tallo grueso muy corto. Sus hojas son grandes, suculentas-fibrosas que terminan en una espina y que están dispuestas en roseta, los márgenes de las hojas presentan pequeñas espinas en forma de gancho o rectas. Las inflorescencias son bracteadas, escamosas y racemosas o paniculadas. Ocasionalmente presentan bulbillos en las inflorescencias. Las semillas son planas y negras. Los agaves son semélparos, esto es que solo tienen una floración durante su ciclo de vida, al cabo de la cual la planta muere.

La planta de Agave ha sido introducida al continente Americano por su alta producción de azúcares en su mayoría en forma de fructosa, el núcleo es la característica más importante de la planta por lo que es adecuado para la preparación de bebidas alcohólicas, artesanales, ornamentales.

7.1.1. TAXONOMÍA DE LA PLANTA DE AGAVE

Pertenece a la familia de las agaváceas, que se agrupan en el orden Asparagales. El género Agave lo constituyen 197 taxas: 136 especies, 26 subespecies, 29 variedades y 7 formas. En 1902, Weber describió el *Agave tequilana* y hasta la fecha las variedades de *Agave tequilana* Weber carecen de estudios taxonómicos particulares ignorándose aún las características propias y completas de cada una.

La familia Agavaceae tiene 8 géneros y aproximadamente 273 especies de las cuales 205 (75%) crecen en México y 151 (55%) son endémicas (Sánchez, et al. 2013).



Figura 1. Variedades de plantas del genero Agave.

Fuente: P. Colunga et al. 2017. Los agaves y las prácticas mesoamericanas de aprovechamiento, manejo y domesticación.

7.2. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN DEL AGAVE AMERICANA



Figura 2. Planta *Agave americana* L.

Fuente: Village nurseries rooted in quality a division of tree town USA. *Agave americana*

Cuadro 1. Taxonomía de *Agave americana* L.

Especie	<i>Agave americana</i> L.
Reino	Plantae
Subreino	Embryobionta
División	Manoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Agavaceae
Género	Agave

Agave americana o pita, es una planta originaria del centro y este de México que fue introducida a Europa por los conquistadores del nuevo mundo, primero como planta ornamental y después como planta textil. Se comporta como invasora y puede colonizar muchos hábitats diferentes como acantilados, bosques del litoral, campos de cultivo y zonas alteradas. Se distingue por tener una espina terminal de casi 3 cm muy duras, rígidas y finas. Las rosetas llegan a medir hasta 2 m de altura y 4 m de ancho, con 80 a 100 hojas mayores a 2 metros (Good-Avila et al., 2006), crecen desde el suelo, grandes, lanceoladas, carnosas de color blanco-azulado o blanco-grisáceo.

Florece una sola vez en su vida (muere tras esta floración (Monocárpico), aunque no sin haber dejado una copiosa descendencia en Hijuelos o retoños de raíz) en un tallo de unos ocho o diez metros y una anchura superior a los 10 cm de diámetro, de él y desde más de la mitad de su longitud van saliendo pequeñas ramas en forma de pirámide terminando cada una en un grupo de flores de color amarillo-verdoso, cada flor tiene un tamaño de unos 5 a 10 cm. El fruto es una cápsula trígona y alargada.

Agave americana se trata de una planta termófila que en la región mediterránea habita en lugares pedregosos soleados, ramblas y arenales, por lo general cercanos al mar y más raramente en el interior. También es habitual a lo largo de los caminos y en los linderos de las parcelas. En general, prefiere suelos muy bien drenados y soleados, siempre próximos a la costa. Es frecuente en comunidades dunares, cunetas, taludes, etc., desde el nivel del mar a los 950 m de altitud (Santiago et al. 2013).

Esta especie figura en el Catálogo Español de Especies Exóticas Invasoras (Real Decreto 1628/2011), ya que forma comunidades tan densas que llegan a desplazar a las especies autóctonas de arenales costeros por competencia del espacio y alteración del medio. Puede hacerse localmente dominante en las comunidades nitrófilas que invaden playas y dunas. Se puede reproducir sexualmente a través de semillas o más activamente de manera asexual por estolones rizomatosos subterráneos, de los que brotan abundantes rosetas, que pueden emitirse a grandes distancias de la planta madre. Precisa suelos muy bien drenados y exposiciones soleadas. Es muy resistente a la sequía y a las altas temperaturas. Aguanta heladas ligeras si no son muy frecuentes (Santiago et al. 2013).

Hasta el momento no existe referencia de parásitos utilizables en lucha biológica para su control. En lo que respecta a herbicidas, tampoco se ha señalado ninguna materia activa ni ningún producto comercial de manera específica para la especie (Santiago et al. 2013).

El corazón de la planta es muy rico en materia azucarada y se puede consumir tras hornearlo; es dulce y nutritivo, fibroso. Las semillas se pueden moler para elaborar harina y se utiliza como un espesante en sopas o mezclado con harinas de cereales para hacer pan. El tallo florífero es empleado a modo de espárragos en algunas zonas. La savia de la floración que se obtiene de tallos cortados se utiliza como un jarabe que es fermentado y se obtiene un mezcal del cual derivan numerosas bebidas, entre ellas el tequila (Santiago et al. 2013).

Agave americana tiene varios usos: ornamental, medicinal, como veneno de vertebrados, agrícola, forraje, control de la erosión. Las fibras derivadas del *A. americana* han demostrado ser más extensibles que otras fibras naturales y tiene un alto contenido de humedad, éstas han sido importantes desde el punto de vista agrícola. De igual forma se cultiva en algunos países y regiones de México como cultivo forrajero, aunque no puede pastarse directamente y requiere procesamiento antes de la alimentación. *Agave americana* también se usa para elaborar bebidas alcohólicas en México y Sudáfrica. Unos de los usos más importantes que ha tenido en México, Brasil, India y China, se trata de utilizarlo como tratamiento tradicional, ya que tiene propiedades antiinflamatorias, antibacterianas y antifúngicas y se puede usar como diurético (GLOBAL INVASIV, 2011).

En Chiapas, en el municipio de Comitán se usan el comiteco (*Agave americana*) y el maguey (*Agave salmiana*) con los que se fabrica pulque que cuando presenta fermentación avanzada se destila para extraer el “mezcal comiteco” (Infante Gil. et al. 2012).



Figura 3. Plantas de *Agave americana* L., de la región de Comitán, Chiapas.

Fuente: Said Infante Gil. 2012. Identificación Taxonómica de agaves (*agave* spp.) utilizados para la elaboración de licor comiteco en Chiapas, México.

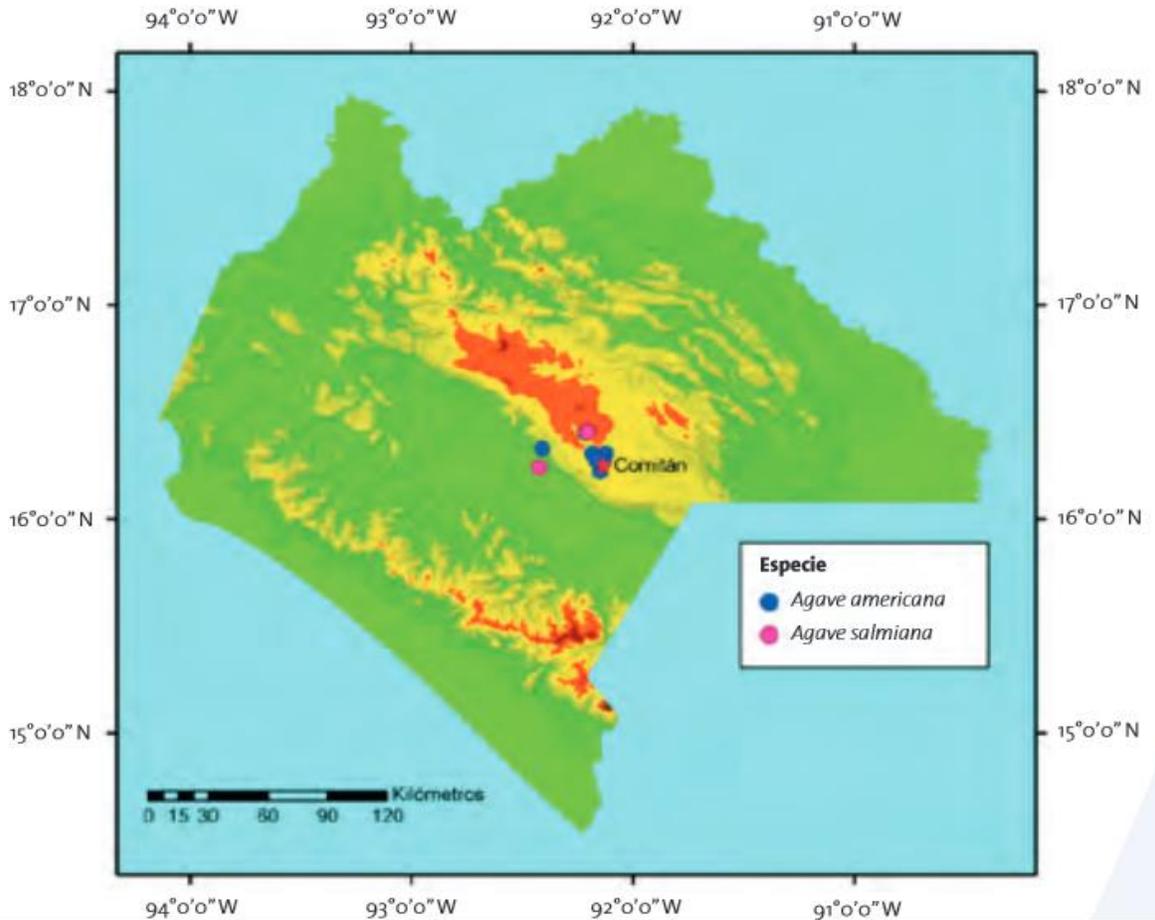


Figura 4. Ubicación de plantaciones de *Agave americana* Y *Agave Salmiana* en la Meseta Comiteca de Chiapas.

Fuente: Said Infante Gil. 2012. Identificación Taxonómica de agaves (*agave spp.*) utilizados para la elaboración de licor comiteco en Chiapas, México.

Fruto

Es una capsula prismática oblonga de 4 cm de largo y lleno de semillas. Al secarse los frutos quedan ligeramente abiertos. Las semillas son planas de color negro, miden aproximadamente de 6 a 8 mm (Bautista, 2006; Sánchez J.C. 2013).

Hojas

Las hojas del Agave son de color verde grisáceo grandes, gruesas y carnosas, pueden almacenar cantidades considerables de agua. Son perennes, presentan espinas marginales y ligeramente cóncavas hacia arriba, una planta madura mide de 1 a 2 m de altura, sin peciolo y con un ancho en la base hasta de 30 cm. Posee

bordes firmes con una hilera de espinas terminando en un vértice con una anchura de 3 a 5 cm. La superficie de la hoja se encuentra cubierta de una membrana resistente blanquecina. Las fibras, de más de 1.5 m, obtenidas de sus hojas, se emplean en saquillos y soguería (Bautista, 2006; Sánchez J.C. 2013).

Raíces

Las raíces de algunas especies producen una pulpa que al mojarse se transforma en una espuma que se emplea como jabón.

En México, la savia de *Agave americana*, se denomina aguamiel, se deja fermentar para obtener una bebida alcohólica llamada pulque, que, por destilación, da un licor incoloro llamado mezcal (Sánchez J.C. et al. 2013).

La variación genética y la selección celular son técnicas que se pueden realizar a nivel celular en lugar de manipular plantas completas en grandes extensiones de suelo. A partir del descubrimiento de que las plantas pueden ser clonadas con mayor rapidez *in vitro* que *in vivo*, en los últimos años se ha incrementado el conocimiento concerniente a la micropropagación. Con esto, se ha abierto la posibilidad de obtener clonaciones que fueron imposibles de lograr *in vivo* en otros tiempos (Pierik, et al. 1987).

7.3. MICROPROPAGACIÓN (CULTIVO *IN VITRO*)

Los orígenes de cultivo de tejidos se remontan a 1902 con los intentos realizados por Haberlandt de cultivar células aisladas de plantas, quien postuló el principio de la totipotencia celular, que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas del cultivo *in vitro* (Navarro et al., 1998., Arana F., 2003). Las herramientas necesarias que hicieron posible el avance de estas técnicas, tales como el desarrollo de medios de cultivo y el conocimiento de los reguladores de crecimiento, no estuvieron disponibles hasta finales de los años 1950, y fue realmente en la

década de 1970 y 1980 que se estableció una verdadera industria de micropropagación (Kitto, 1997., Arana F., 2003).

El cultivo "*in vitro*" de células, tejidos y órganos vegetales, permite estudiar todos los factores que influyen sobre el metabolismo, crecimiento y desarrollo de los vegetales, ya que numerosas condiciones (químicas, físicas y biológicas) pueden ser controladas y variadas según su objetivo determinado. Esto permite que estas técnicas tengan un campo de acción muy amplio dentro de la investigación científica (Lallana V.H. y Ma. del C., 2003).

La micropropagación consiste en cultivar segmentos de plantas seleccionadas que son conocidos como explantes. Dichos explantes son cultivados *in vitro* en un medio de cultivo conformado por macro y micronutrientes, azúcares como fuente de carbono, reguladores de crecimiento, vitaminas, un agente gelificante, así como condiciones de luz y temperatura que son específicas de acuerdo a la especie vegetal con la que se esté trabajando. Bajo estas condiciones se busca inducir la producción de brotes en los explantes para su posterior subcultivo en forma repetitiva, hasta producir plantas con las características genéticas de la planta original (Hussey, 1983., Ayala L. 2010).

Las técnicas de micropropagación o propagación *in vitro* tienen la ventaja de producir grandes cantidades de plantas en espacios relativamente reducidos y durante todo el año, a diferencia de los métodos convencionales de propagación, ya sea por semilla, hijuelos (rizomas) o bulbilos, con los cuales solo se realiza la actividad de propagación una vez al año. Generalmente las técnicas de propagación *in vitro* semejan eventos naturales, como la producción de ramas y raíces; y más espectacularmente la producción de embriones. Estas formas de propagación no siempre se utilizan con el propósito de una producción masiva de las plantas de alto valor, sino que también se utilizan para mejorar genéticamente alguna especie de interés para el hombre (Ayala L. et al. 2010).

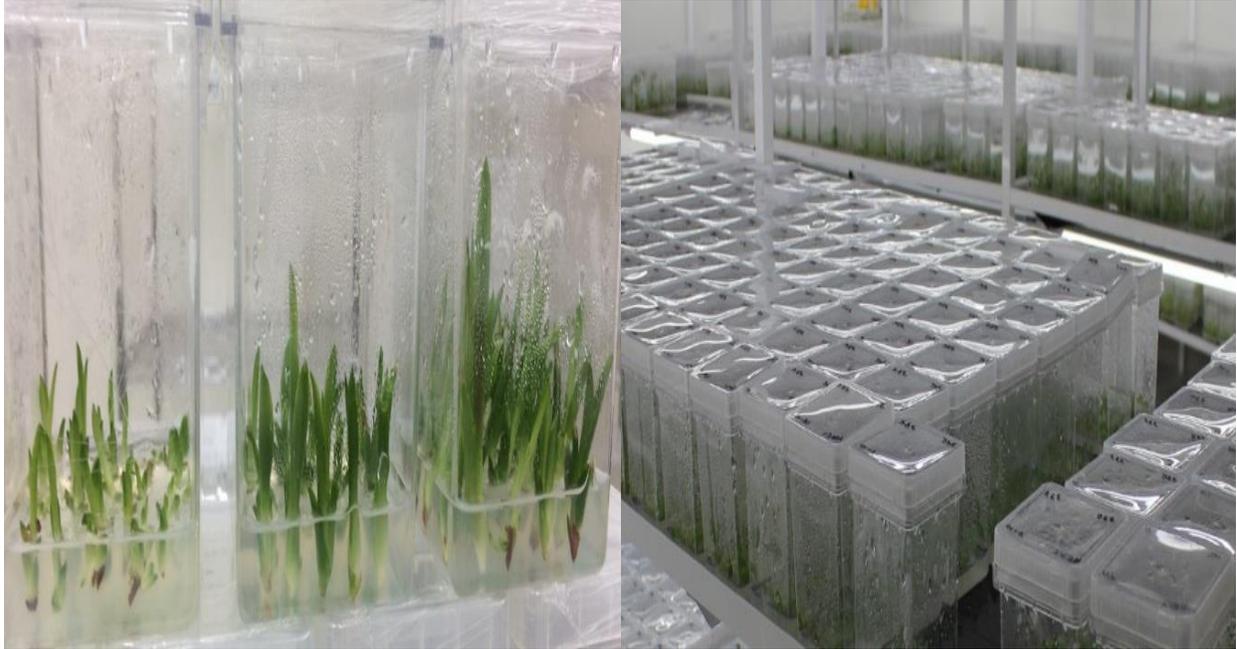


Figura 5. Micropropagación de *Agave americana* L.

Fuente: Salinas F. 2018. Micropropagación *in vitro* del Agave. Mezcológica.

7.4. EXPLANTE

Un explante es una pequeña porción del tejido vegetal que funciona como generador de nuevas plantas en el cultivo *in vitro*. La elección del explante adecuado constituye el primer paso para el establecimiento de los cultivos; dicha elección está determinada por el objetivo perseguido y la especie vegetal utilizada. La selección de la fuente de explante es un paso crucial en el establecimiento exitoso de un cultivo de tejidos vegetales (Robert et al., 2004; Ayala L., 2010).



Figura 6. Explantes de *Agave americana* utilizadas para micropropagación.

Fuente: Naivy P. A. Et al. 2015. Establecimiento y multiplicación *in vitro* de brotes de *Aloe vera*.

El estado del desarrollo del material inicial es un factor muy importante, ya que las plantas jóvenes tienen mayor capacidad de regeneración que las plantas adultas, ya que las plantas maduras no son recomendables debido a que son muy fibrosas y difíciles de cortar, en términos generales, están más infestados con microorganismos y es más difícil inducir la formación de nuevos brotes de estos tejidos (Robert., et al. 2004)

El explante contiene en la superficie una abundante microflora, que debe ser eliminada por medio de una desinfección antes del corte del tejido u órgano que será empleado como inóculo. El agente desinfectante más adecuado, así como su concentración y el tiempo de desinfección debe ser determinado para el material vegetativo con el que se trabaja (Yoeman y Macleod, 1977; George, 1993; Ayala L., 2010)

7.5. INDUCCIÓN DE CALLOS

Un callo consiste de una masa amorfa surgida de la proliferación de células del parénquima. Frecuentemente es el resultado de una herida, un callo se forma en el

corte de un tallo o raíz. Los callos no tienen patrones predecibles de organización, están presentes en centros localizados de actividad meristemática y a menudo aparecen en regiones cambiales rudimentarios con zonas de diferenciación vascular. Una de las características importantes de callo desde un punto de vista funcional, es su irregular crecimiento, teniendo el potencial para desarrollar raíces normales, brotes y embriones que forman plántulas.

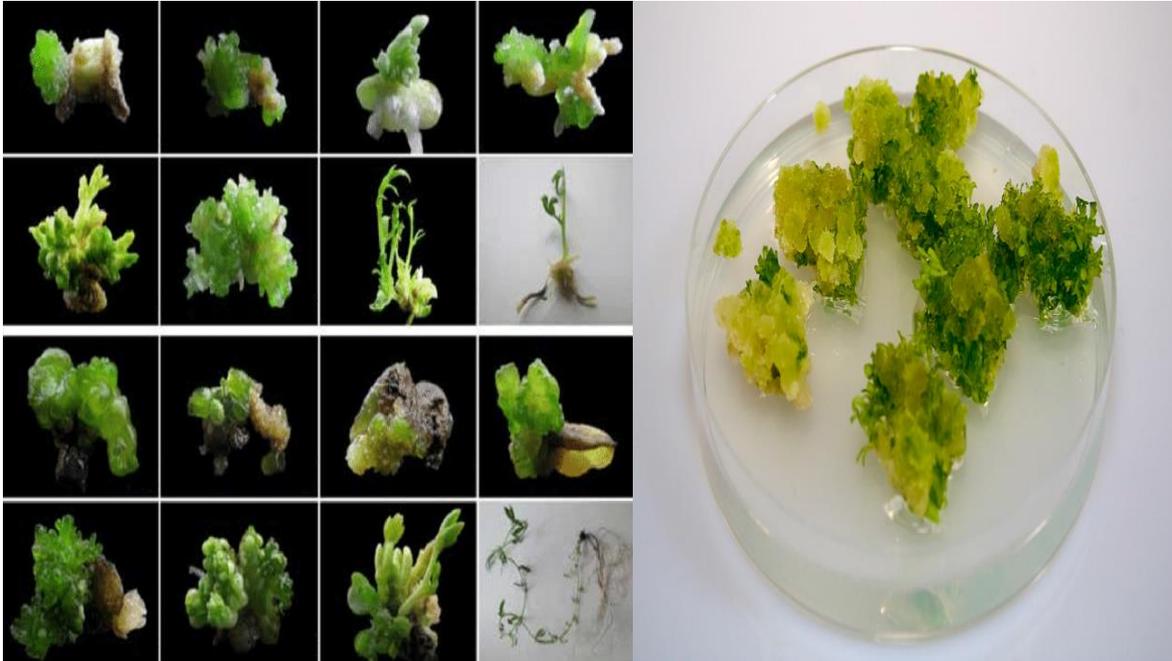


Figura 7. Formación de callo a nivel *in vitro*.

Fuente: Olivera G. et al. 2017. Multiplicación *in vitro* y embriogénesis somática de *Perezia pinafitida* planta medicinal andina

Si el objetivo final es el obtener callos, es factible la utilización de una vasta gama de explantes que cultivados en condiciones apropiadas permiten la proliferación callosa. Todo aquel explante que contenga células nucleadas vivas se pueden emplear potencialmente para la obtención de callos. Frecuentemente se utilizan ápices o meristemos caulinares, hojas, entrenudos, cotiledones, raíces, anteras e inclusive tejidos altamente diferenciados como los provenientes de los frutos (Pierik, 1987; George, 1993; Ayala L., 2010)

En el caso de las plantas en las cuales la obtención de callos no está limitada por el tipo de explante, éste se seleccionará por razones prácticas como disponibilidad, facilidad de manipulación, baja contaminación por microorganismos y rápida respuesta *in vitro* (Lallana y Ma. del C., 2003).

La característica general del crecimiento de callos, abarca una compleja relación entre el material usado para iniciar los callos, la composición del medio, y las condiciones experimentales durante el periodo de incubación. Algunos desarrollos de callos son fuertemente lignificados y duros en textura, los que no se pueden separar fácilmente en pequeños fragmentos. Por el contrario los callos frágiles se separan fácilmente y se les denomina cultivos friables, frágiles (“frieble cultures”). Los callos pueden ser amarillentos, blancos, verdes, o coloreados con antocianinas. La pigmentación será en todo el callo, o en algunas regiones sin pigmentar. Su anatomía, es de variación considerable a lo largo de la diferenciación celular (Lallana y Ma. del C., 2003).

Es necesario cambiar a un medio fresco el callo que ha crecido asociado al tejido original, debido que a un determinado periodo de tiempo, provocara el agotamiento de nutrientes y una desecación gradual del agar por la pérdida de agua. De igual manera los callos secretan metabolitos secundarios, que conforme pase el tiempo, éstos pueden ir acumulándose en niveles tóxicos en el medio, de tal manera que afecte en el crecimiento de los callos llevándolos hasta la fase de muerte.

7.6. SUSPENSIÓN CELULAR

En las últimas décadas se han desarrollado diferentes sistemas para los cultivos de protoplastos, células, tejidos y órganos vegetales; uno de ellos es el cultivo en suspensión (suspensiones celulares), el cual constituye una forma para mantener y propagar células vegetales.

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio en movimiento. Estas suspensiones pueden ser permanentes mediante el suministro continuo de nutrimentos.

Para el cultivo de suspensiones celulares de una gran variedad de plantas se ha utilizado el medio MS desarrollado por Murashige y Skoog (1962) para el cultivo de tejidos de tabaco, como también el medio B-5 de Gamborg (1968). También se han utilizado otros medios, pero su composición no difiere mucho a los anteriores. Lo que es de gran relevancia es el nivel óptimo de auxinas y citocininas, que pueden ser diferentes, dependiendo del material vegetal (Szabados. et al. 1991).

Las suspensiones celulares se inician generalmente mediante la incubación de trozos de callos friables en medios líquidos que están en movimiento continuo. Comúnmente se emplean frascos Erlenmeyer, en los cuales se deposita el medio líquido con los trozos de callo dispersos en él, hasta llegar aproximadamente 1/5 de la capacidad de los frascos; éstos se ponen luego a incubar en un agitador giratorio a 80-150 rpm, bajo luz continua y a 25°C de temperatura. Mediante subcultivos semanales, las suspensiones celulares quedan establecidas después de varios días.

El mejor inóculo para la iniciación de suspensiones celulares es sin duda un callo friable, con un alto ritmo de división celular (King, 1984; Szabados. 1991). La selección de células aptas para crecer en suspensiones celulares se puede efectuar, en un medio sólido, mediante el plaqueo de una suspensión recién comenzada, para continuar únicamente con la suspensión de colonias celulares friables y de rápido crecimiento (Wilson et al., 1975; Szabados. 1991).

Para mantener las suspensiones celulares se pueden usar diferentes sistemas de cultivo, los cuales se pueden clasificar básicamente en tres tipos: cerrados, continuos cerrados, y continuos abiertos.

El sistema cerrado es el más utilizado en los laboratorios de investigación de tipo agrícola que utilizan técnicas de cultivo de células (Szabados. et al. 1991).

7.7. HORMONAS DE CRECIMIENTO VEGETAL

Las hormonas vegetales o fitohormonas son compuestos naturales producidos en las plantas y son las que definen en buena medida el desarrollo. Se sintetizan en una parte u órgano de la planta a concentraciones muy bajas (< 1 ppm) y actúan en ese sitio o se translocan a otro en donde regulan eventos fisiológicos definidos (estimulan, inhiben o modifican el desarrollo). Los nutrimentos quedan fuera de este término porque las plantas no los producen, sino los toman, así mismo los aminoácidos y enzimas por encontrarse a mayores concentraciones en la planta. En general las hormonas se encuentran en todas partes de la planta y en todo momento, aunque eventualmente se concentran más en los sitios de mayor demanda (Díaz, 2017).

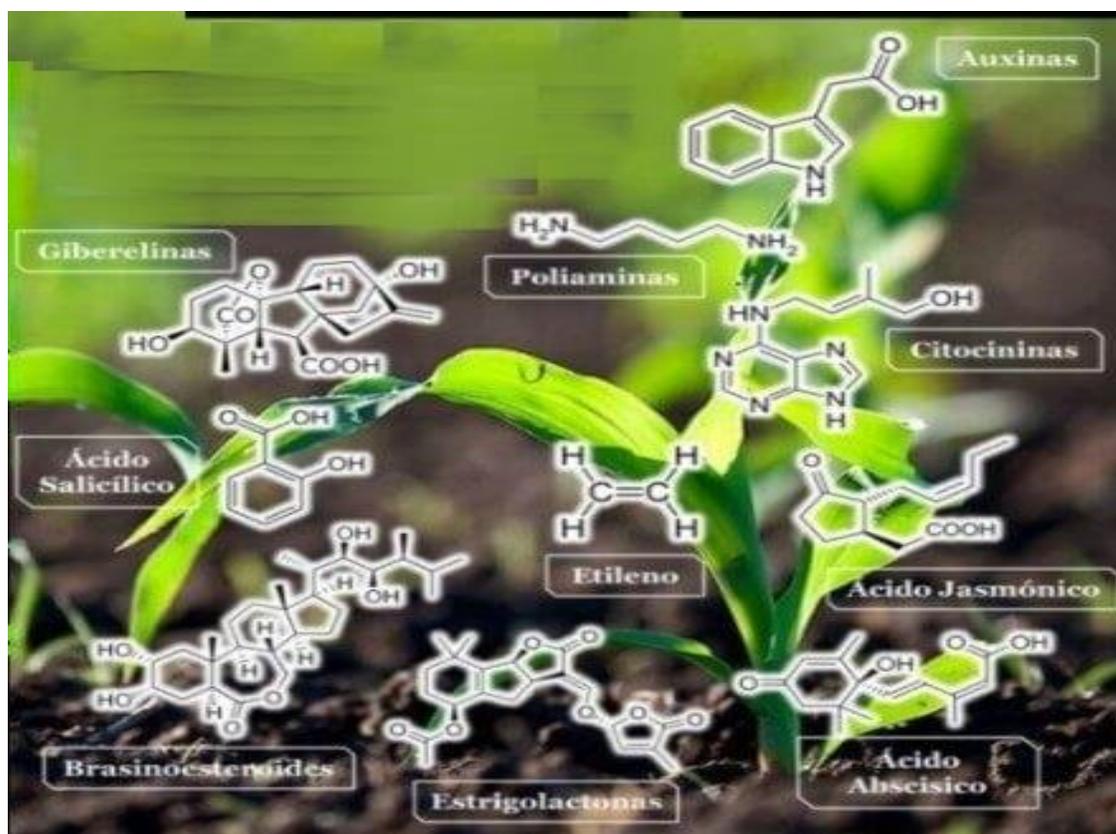


Figura 8. Tipos de Hormonas vegetales.

Fuente: Díaz, M. D. 2017. Las Hormonas Vegetales en las Plantas. Serie Nutrición Vegetal Núm. 88. Artículos Técnicos de INTAGRI. México.

7.7.2. EL BALANCE HORMONAL EN LAS PLANTAS

Las hormonas pueden actuar solas o en conjunto y pueden regular diversos eventos fisiológicos, pero el punto clave es el balance entre ellas, algunas son “protagónicas” de los eventos, pero necesitan de otras para ser más eficientes en los procesos, de este hecho proviene el término “bioactividad” hormonal, que indica la capacidad de una hormona para regular un evento fisiológico adecuadamente (Díaz, 2017).

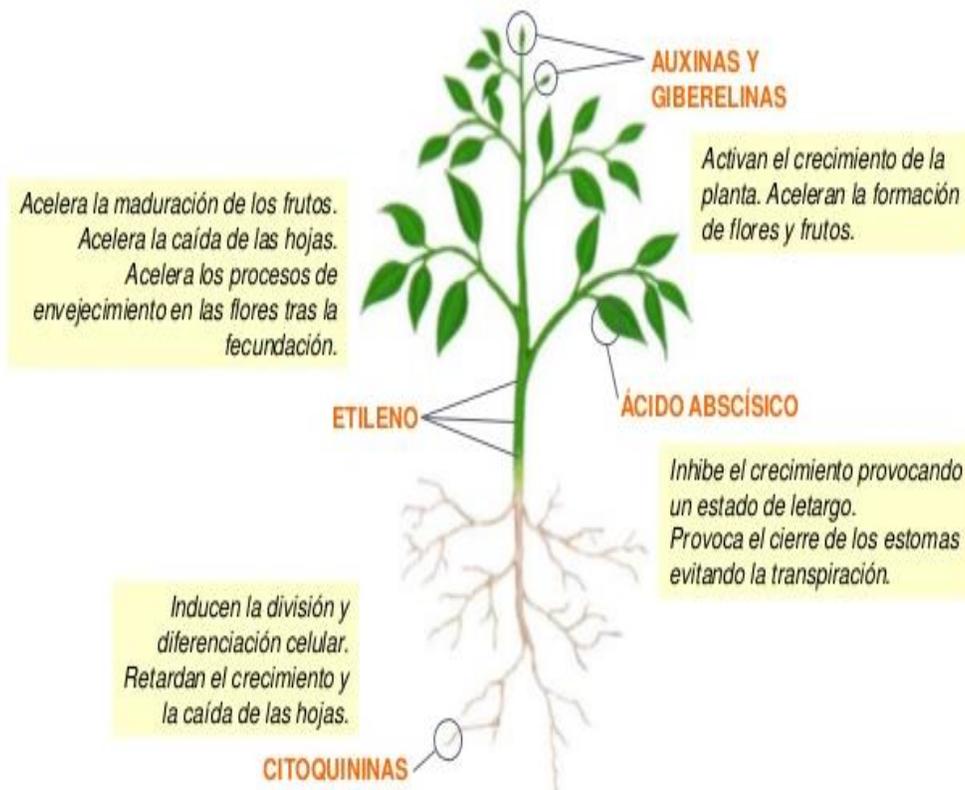


Figura 9. Eventos fisiológicos en los que actúan las hormonas vegetales.

Fuente: Alfredo L. 2017. Las hormonas vegetales de planta.

7.7.3. LAS AUXINAS Y SU PAPEL EN LAS PLANTAS

Las auxinas son por excelencia hormonas del crecimiento vía división y alargamiento (raíz, tallo, hoja, fruto, etc.) y particularmente inducen la formación de raíces (ej. enraizamiento de esquejes). Participan en los tropismos de las plantas, inhiben la senescencia o envejecimiento de los tejidos, inhiben la brotación de

yemas laterales (axilares) e inhiben la caída de órganos. Se sintetiza auxinas a partir del aminoácido triptófano, siendo el ácido indolacético (AIA) la auxina más relevante en cuanto a cantidad y actividad. Algunos nutrientes como el Zn y el B tienen estrecha relación con las auxinas, ya que su deficiencia resulta en una menor cantidad de auxinas en el tejido, con lo que se reducen los procesos de división y elongación celular. En varios cultivos el acortamiento de entrenudos es característico, en parte por la baja síntesis de auxinas (Díaz, 2017).

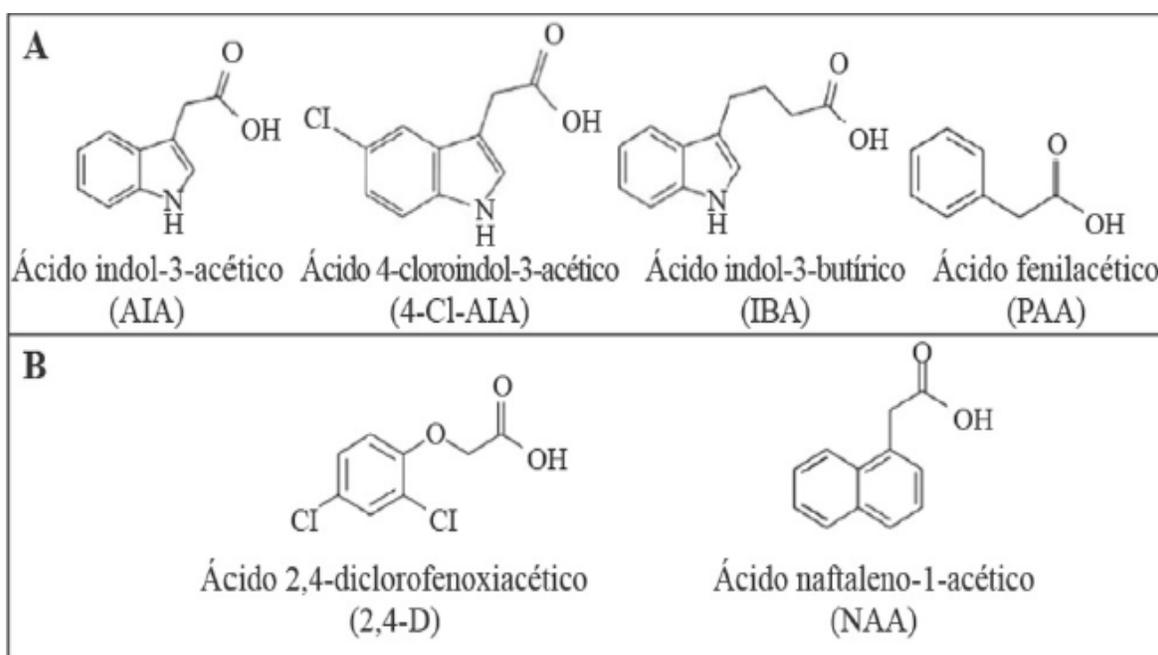


Figura 10. Auxinas. **A)** Auxinas naturales. **B)** Auxinas producidas por síntesis química industrial.

Fuente: Vega C. P. et al. 2016. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias.

Las auxinas participan en todos los procesos de desarrollo de las plantas y, a nivel celular, intervienen en los procesos de división, elongación y diferenciación celular. Una de las características más sobresalientes de ésta fitohormona es que está distribuida diferencialmente entre células y tejidos; en algunos casos se acumula localmente en una célula o un grupo de células, en otros cambia su distribución

entre células y, finalmente, también puede tener una distribución diferencial en los tejidos vegetales (Garay et al. 2014).

Las auxinas se sintetizan en todos los tejidos de la planta siendo los más jóvenes, los de mayor actividad. Hay dos vías principales de síntesis: una dependiente de triptófano (Trp) que tiene cuatro ramificaciones cuyos nombres se derivan de uno de los intermediarios más importantes de cada una de las vías: el 3-indol acetamida (IAM), el 3-indol acetaldoxima (IAOx), la triptamina (TAM), y la del ácido 3-indol pirúvico (IPA) y otra independiente de triptófano pero que se deriva de un precursor del mismo. La regulación de estas vías sintéticas depende de estímulos externos como son la luz, los nutrientes, la sequía, el frío o la herida y de factores internos como son otras hormonas. Además, la transcripción de los genes que sintetizan las enzimas que participan en estas vías está regulada espacialmente lo que sugiere una regulación dinámica de la síntesis del IAA en el tiempo y en el espacio (Garay et al. 2014).

La auxina biológica más activa que se conoce es el IAA aunque ya se han identificado otras formas de auxinas presentes en plantas como son el ácido indol-3-butírico (IBA), el ácido fenilacético (PAA) y la forma clorada del IAA en chícharo (4-Cl-IAA). Después del descubrimiento del IAA, se han sintetizado muchos compuestos que tienen actividad de auxinas y que han sido utilizados como herbicidas (ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-picolínico (picloram) y ácido 2-metoxi, 3,6-dicloro benzóico (dicamba)) o como enraizados en cultivos de tejidos (como el ácido a-naftalenacético (a-NAA)). Estos compuestos han resultado muy útiles debido al hecho de que son más estables (2,4-D y a-NAA), tienen mayor difusión hacia dentro de las células (a-NAA) o a que se metabolizan más lentamente (2,4-d) que el IAA aunque es importante notar que son muy tóxicos para el ser humano (Garay et al. 2014).

7.7.4. LAS CITOCININAS Y SU PAPEL EN LAS PLANTAS

La raíz es el principal órgano de síntesis de estas hormonas, aunque también se sintetizan en cualquier tejido, sobre todo en sitios de intensa división celular. Activan el crecimiento de las yemas laterales, estimulan el crecimiento de frutos, retardan la senescencia en hojas y estimulan la movilización de nutrimentos. Existen varias citocininas naturales de las cuales la zeatina, benciladenina y kinetina son las más importantes. Su movimiento es preferentemente hacia arriba, aunque también se mueve hacia abajo, todo depende del sitio donde se demanden con mayor intensidad. El N es de los principales elementos que tiene relación con la presencia de esta hormona en los tejidos (Díaz, 2017).

Las citocininas o citoquininas influyen en el crecimiento vegetal de varias maneras, incluidos el control de la división y diferenciación celulares, contrarrestando la dominancia apical, y retrasando el envejecimiento de las hojas. El nombre de citocininas se refiere a su papel en la división celular o citocinesis. Suelen ser formas modificadas de adenina y, originariamente, se descubrieron como resultado de una serie de experimentos realizados en plantas de tabaco, cuyo fin era encontrar agentes químicos estimulantes del crecimiento celular (Murray et al. 2005).

En el cultivo de tejidos vegetales las citocininas están asociadas tanto con la división celular como con la diferenciación que conduce a la producción de yemas del vástago. Las citocininas en sí mismas presentan pocos efectos en las células de cultivo, pero cuando se aplican junto con la auxina, las células cultivadas comienzan a dividirse y diferenciarse. Tales efectos dependen en gran medida de la concentración de los reguladores. Si se aplica únicamente auxina, las células cultivadas se alargan, pero no se dividen. Si se añade también una citocinina, los efectos dependen de la proporción auxina-citocinina. Si la concentración de citocinina es baja en comparación con la de auxina, las células crecen, se dividen y se diferencian, convirtiéndose en raíces. Si la concentración de citocinina es moderada, las células crecen y se dividen rápidamente para producir una masa de células no diferenciadas denominada callo, pero no llegan a diferenciarse. Si hay una concentración elevada de citocinina, las células crecen, se dividen y se

diferencian, convirtiéndose en yemas del vástago. Se ha sabido que los efectos de la citocinina y de la auxina en los tejidos son aplicables a numerosos tipos de plantas (Murray et al. 2005).

Según su origen se pueden distinguir dos tipos de citocininas: aquellas naturales generadas por las plantas y otras artificiales, sintetizadas por el hombre. Todas las citocininas naturales se generan a partir de DMAPP (vía del ácido mevalónico) y 5'-AMP y su síntesis acontece principalmente en la raíz, aunque también en el meristema apical y en semillas inmaduras. La mayoría de las citocininas naturales y artificiales conservan la base adenina, aunque a las segundas se les ha ligado diversas moléculas, generándose así, por ejemplo, la benciladenina (BA) o la furfurilaminopurina (kinetina) (Jordán & Casaretto, 2006).

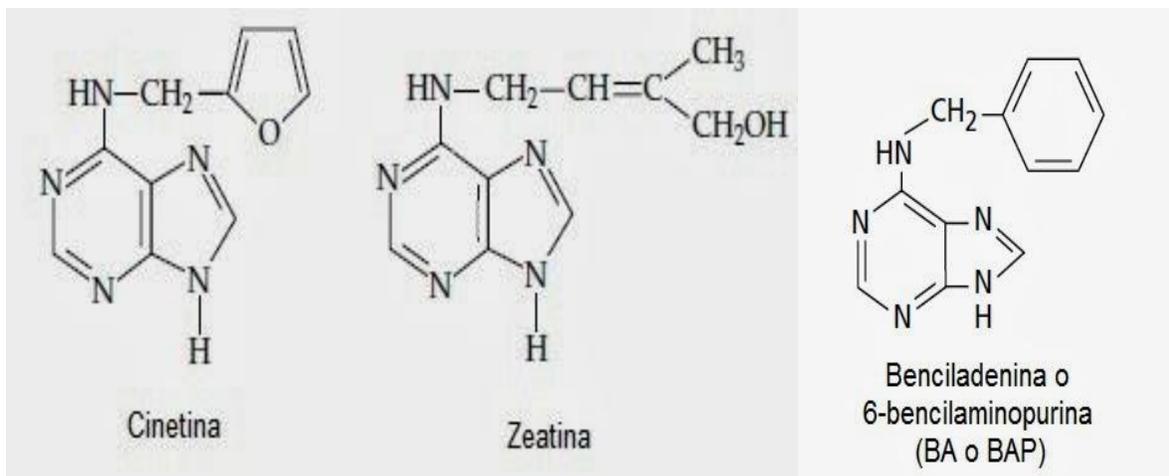


Figura 11. Citocininas. **A)** Citocininas naturales. **B)** Citocinina producida por síntesis química.

Fuente: Christian N. S. 2012. Citocininas. Apuntes de Fisiología vegetal.

VIII. PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS

Procedimientos generales

Todos los ensayos en el laboratorio se realizaron en condiciones estériles. El material instrumental (pinzas, mangos de bisturí, espátulas, vidrios para cortes) de trabajo empleado y los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 15 Lb de presión por un tiempo que oscilaba entre los 15 y 20 min.

En el trabajo con suspensiones celulares se utilizaron micropipetas, coladores de acero y papeles filtro y puntas de micropipetas se esterilizaban, a excepción de la micropipeta, en autoclave a las condiciones ya mencionadas.

La manipulación del material se realizó en cámaras de flujo laminar. La cual se sometía a esterilización con rayos UV (ultravioletas) durante 25 o 30 minutos. En todos los experimentos el pH del medio de cultivo ya sea líquido o sólido se ajustó 5.7.

Recolección de plántulas de *Agave americana* (Material vegetal)

Para esta investigación se utilizó como material vegetal las plántulas de *Agave americana*, se obtuvieron *In vitro* del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, ubicado en KM 29020, Carr. Panamericana 1080, Boulevares. Dichas plántulas fueron generadas como parte de la Tesis titulada Organogénesis indirecta de *Agave americana* por la alumna de Licenciatura Sheila Jazmín Reyes Sambrano.

Inducción de Callos

Para ver el efecto de los reguladores sobre la inducción de callo se usó la técnica de cortes delgados el cual consistió en tomar como explante el meristemo realizando secciones de aproximadamente de 0.5 cm, obteniendo tres secciones

principales (base, media y apical). Dichas secciones se colocaron en pequeños frascos con medio MS semisólido propuesto por (Murashigue y Skoog, 1962) (Cuadro 2).

Para la inducción de callos se utilizaron cuatro tratamientos los cuales consistieron en el uso de Los reguladores ácido naftalenacético (ANA) en combinación con bencilaminopurina (BAP) ambos a 0.5 mg L^{-1} y ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D) a tres diferentes concentraciones (0.25 , 0.5 y 0.75 mg L^{-1}) haciendo un total de 4 tratamientos por triplicado y como unidad experimental un frasco con 20 mL de medio MS con tres cortes.

Cuadro 2. Soluciones para preparación de medio MS

SOLUCIONES STOCK	1 LITRO
A	1 mL
B	1 mL
C	2.5 mL
D	2.5 mL
E	5 mL
F	10 mL
SACAROSA	30 g
KNO ₃	1.90 g
NH ₄ NO ₃	1.65 g
PHYTAGEL	2.5 g

Células en suspensión

Los callos obtenidos a partir de explantes de *Agave americana* por los fitorreguladores ANA+BAP a 0.5 mg L^{-1} y 2,4-D a 0.25 , 0.50 y 0.75 mg L^{-1} , fueron utilizados para la generación de células en suspensión; los cuales se colocaron en

matraces Erlenmeyer con medio MS líquido utilizando los fitorreguladores ANA+BAP a 0.5 mg L^{-1} y 2,4-D a 0.5 mg L^{-1} . Los callos seleccionados fueron tipo friable con el fin de que se disgregue en el medio líquido para la obtención de células. De los cuales se obtuvieron 8 matraces inoculados los cuales se pusieron en agitación a 100 rpm en la zona *in vitro* del laboratorio a temperatura de 25°C.

Viabilidad de células (Azul de Tripán)

El azul de tripán es un colorante que posee la capacidad de teñir a tejidos y células muertas. Se tomó un pequeño volumen de la suspensión celular el cual se homogenizó y añadió 10 μL a un microtubo y posteriormente se le añadió 90 μL de azul de tripán al 0.4%, esta solución se mezcló bien hasta quedar totalmente homogéneo, se tomó 10 μL de esa solución y colocó en una cámara de Neubauer, posteriormente colocándolo al microscopio para observar si las células se tiñen.

Parámetros a evaluar

Se determinará que sección del explante seleccionado (meristemo) de la planta *Agave americana L.*, es la adecuada para la generación de callos, de igual manera se evaluará la formación de callos con las distintas concentraciones de fitohormonas como las características de ellos, como también se calculará el porcentaje de callos obtenidos por cada tratamiento. Y la determinación de la fitohormona y su concentración adecuada para la formación de suspensiones celulares de *Agave americana*.

IX. RESULTADOS

INDUCCIÓN DE CALLOS

Las tres secciones del explante presentaron diferentes respuestas a las concentraciones evaluadas de las hormonas reguladoras utilizadas (Fig. 12). Con la auxina 2,4-D a concentración de 0.25 mg L^{-1} únicamente en la base del meristemo hubo presencia de callo después de cuatro semanas, en la semana seis presentó un oscurecimiento en los tejidos en el medio (Fig. 12A), dicho oscurecimiento pudo ser ocasionado por fenoles presentes en la planta de *A. americana*, tal oxidación que ocurre en la heridas causadas por el corte en los tejidos jóvenes, generando daño o incluso la muerte celular (Azofeifa, et al. 2009) inhibiendo así la formación de callos.

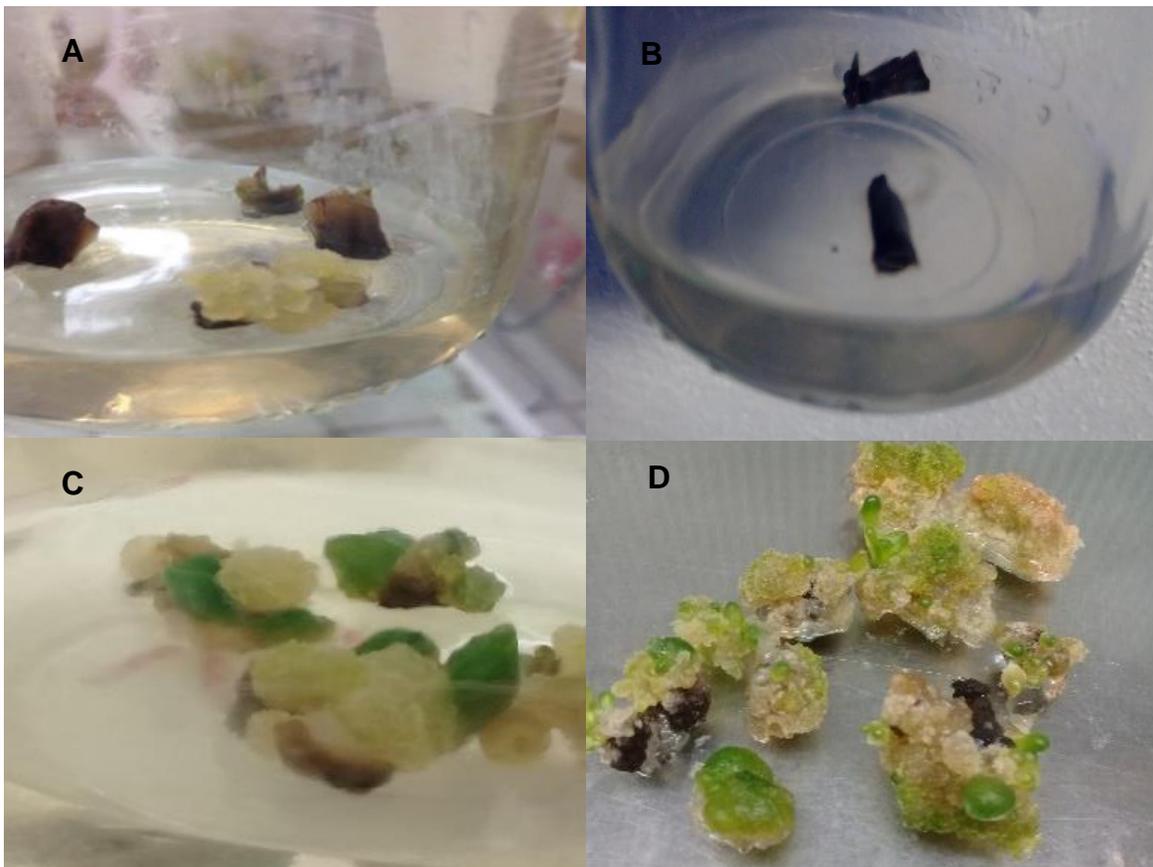


Figura 12. Respuestas del tipo de sección de explante a las concentraciones de fitorreguladores para el proceso de calogénesis. **A)** Oxidación en la base del meristemo en medio MS con 2,4-D (0.25 mg L^{-1}) a las 6 semanas. **B)** Oxidación en parte media de meristemo en medio MS con 2,4-D (0.25 mg L^{-1}). **C)** Base de meristemo en medio MS con 2,4-D (0.75 mg L^{-1}). **D)** Meristemo en medio MS adicionado con ANA+BA (0.5 mg L^{-1}).

Con las concentraciones de Auxina 2,4-D de 0.5 y 0.75 mg L⁻¹ para las sección base del meristemo (Fig.12C) presentaron formación de callos con la presencia de embriones de baja frecuencia. Al utilizar la auxina ANA en combinación con la citocinina BA ambas a concentración de 0.5 mg L⁻¹, presentaron formación de callos en todas las secciones del meristemo (Fig. 12D).

Para la base del meristemo el mejor tratamiento fue utilizando la auxina 2,4-D en concentraciones de 0.50 y 0.75 mg L⁻¹, ya que ambos presentaron los porcentajes más altos en la presencia de callo con un 80% de formación. Al utilizar la parte media y apical del explante se presentó un oscurecimiento en los tratamientos adicionados con 2,4-D en las tres concentraciones (0.25, 0.5 y 0.75 mg L⁻¹), sin la presencia de callos a las cuatro semanas de permanecer en el medio.

Cuadro 3. Porcentaje de formación de callo en meristemo

Tratamiento	Posición del explante % formación de callo		
	Base	Medio	Apical
2,4-D			
0.25 mg L⁻¹	75	0	0
0.50 mg L⁻¹	80	0	0
0.75 mg L⁻¹	80	0	0
ANA+BA			
0.50 mg L⁻¹	100	100	100

Por lo tanto para la Auxina 2,4-D el mejor tratamiento fue utilizando la base del meristemo en concentraciones de 0.5 y 0.75 mg L⁻¹ ya que ambas presentaron un porcentaje mayor en generación de callos a comparación a la concentración de 0.25 mg L⁻¹ que obtuvo el 75% (Cuadro 3); Para la combinación de hormonas ANA+BA a 0.5 mg L⁻¹, en todas las secciones del explante seleccionado se obtuvo generación de callos con un porcentaje más alto que lo generado con 2,4-D. sin embargo, la

combinación de ANA y BA se produjeron brotes reduciendo así el volumen de callos obtenidos (Fig. 12D).

Otras características a considerar para la generación de suspensiones celulares fueron las características como color y textura en los callos obtenidos con los tratamientos (Cuadro 4). El mejor inóculo para la iniciación de suspensiones celulares es sin duda un callo friable, ya que se mantienen en crecimiento constante comparada con el callo compacto, además de ser más fáciles de disgregar.

Cuadro 4. Características de color y textura de los callos presentes en meristemos

Regulador	Tratamiento	Tipo de callo	Coloración según la posición del explante		
			Base	Medio	Apical
2,4-D	0.25 mg L ⁻¹	Friable	Cremosa	Cremosa	Cremosa
	0.50 mg L ⁻¹	Friable	Cremosa	Cremosa/verde	Cremosa/verde
	0.75 mg L ⁻¹	Friable	Cremosa	Cremosa/verde	Cremosa/verde
ANA+BA	0.50 mg L ⁻¹	Friable	Cremosa/verde	Cremosa/verde	Cremosa/verde

SUSPENSIÓN CELULAR

En la primer evaluación para establecer la línea celular, se utilizaron los callos provenientes de los tratamientos con 2,4-D a 0.5 y 0.75 mg L⁻¹, y ANA+BA (0.5 mg L⁻¹,) de las cuales se obtuvieron características de callos semejantes, cambiándolos a un medio líquido con la adición de 2,4-D utilizando las concentraciones de 0.5 y 0.75 mg L⁻¹, al paso de cuatro semanas en medio líquido, ambas concentraciones presentaron embriones somáticos (Fig. 13), mientras que en las concentraciones de 0.25 mg L⁻¹ no hubo ningún tipo de respuesta.

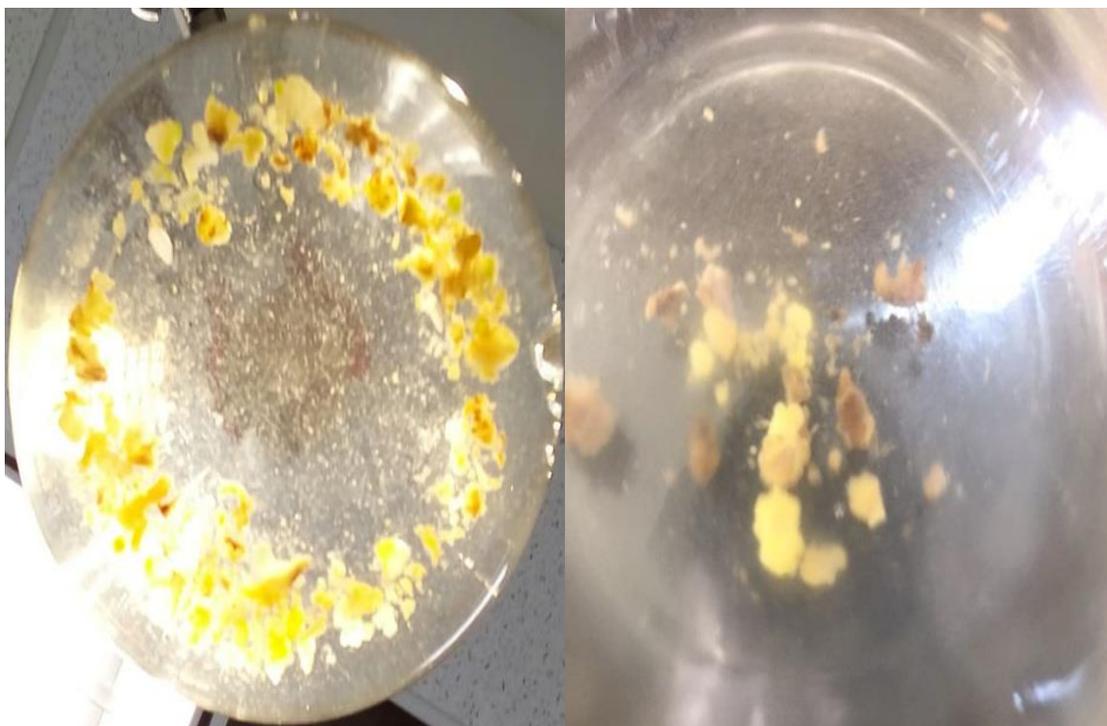


Figura 13. Formación de embriones de Meristemo en medio MS líquido adicionado con 2,4-D (0.5 mg L⁻¹).

Usando la combinación de hormonas de ANA+BA ambas a una concentración de 0.5 mg L⁻¹, como respuesta al pasar los días se presentó un oscurecimiento de los callos, completándose así en la tercer semana, de igual forma se observó la disgregación de los callos friables conforme se iba cambiando o resembrando en

medio líquido nuevo, formando así la suspensión celular en donde al pasar las semanas no hubo incremento de biomasa (Fig. 14).

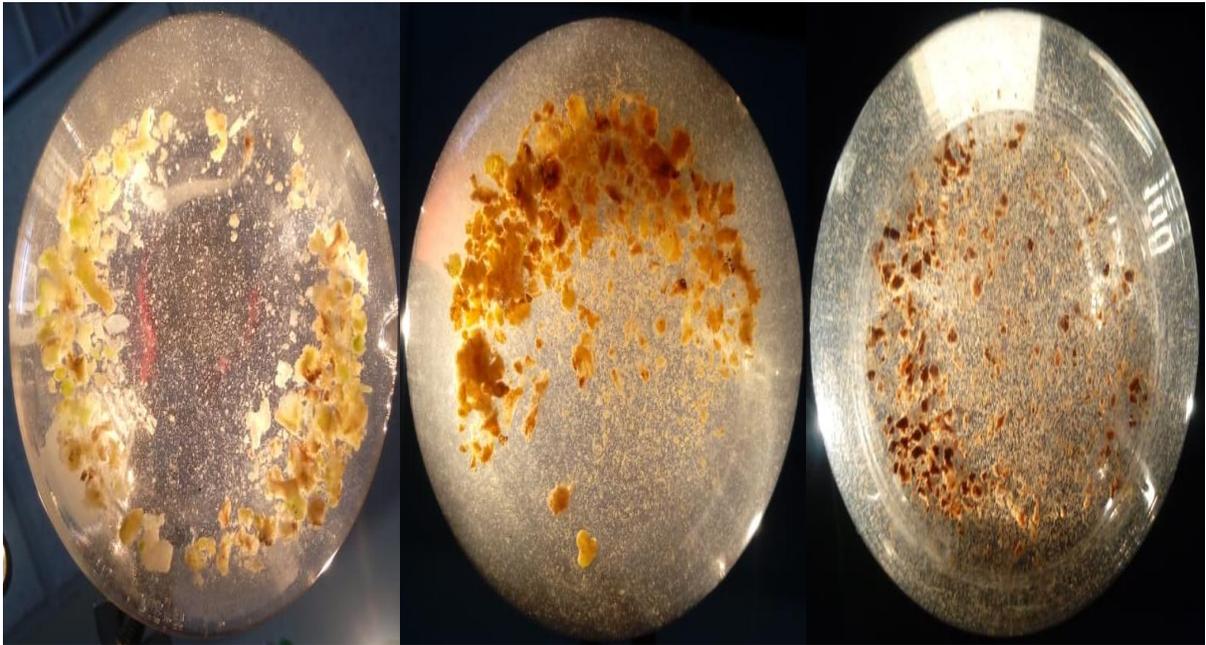


Figura 14. Formación de suspensión celular de Meristemo en medio MS líquido adicionado con ANA+BAP. **A)** Día cero de suspensión celular. **B)** Semana uno de suspensión celular. **C)** Semana cuatro de suspensión celular.

Con respecto a las hormonas utilizadas, se ha propuesto que las auxinas no regulan la división celular en las suspensiones, debido a su interacción con puntos específicos de control del ciclo nuclear. Por lo que las Citocininas se requieren ocasionalmente para promover divisiones en células cultivadas en suspensión. Sugiriendo así que las Citocininas regulan la síntesis de proteínas en la fase G_0 o en la transición de las fases G_2 y M (William et al. 1993). Por lo que da coherencia a los resultados obtenidos ya que al utilizar 2,4-D se encontró formación de embriones, en cambio al utilizar una auxina en combinación con una citocinina ANA+BA en ellas si hubo generación de suspensiones celulares. Para el caso de Agave no existe literatura que indique el tipo de respuesta que se puede generar con respecto al tipo y concentración de hormona para suspensiones celulares.

Para la viabilidad de las células se utilizó el método de azul de tripán, la cual nos da a conocer que las células que se tiñen de azul son las que tienen la membrana dañada, es decir, que están muertas. Por lo que se observaron células viables en el medio de cultivo, es decir, se generó suspensión celular sin diferenciación celular (Fig. 15).

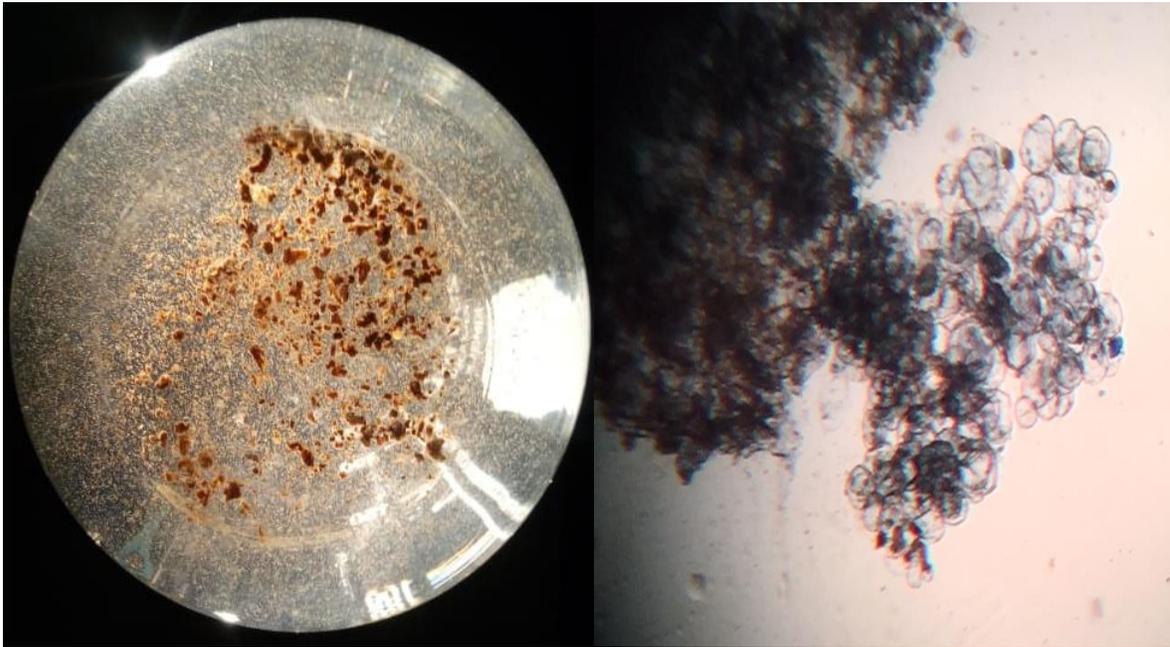


Figura 15. Células viables en el medio de cultivo líquido con ANA+BA. **A)** oscurecimiento de callo a partir de los 21 días. **B)** Células no teñidas por el colorante azul tripán después de seis semanas.

X. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se encontró la sección de meristemo más adecuada para la generación de callo. Para la auxina 2,4-D el mejor porcentaje de formación de callo fue utilizando la sección base del meristemo, a una concentración de 0.5 mg L^{-1} y a 0.75 mg L^{-1} ya que a esa concentración se obtuvo más porcentaje de formación de callo. Y para la combinación de hormonas ANA+BAP utilizando únicamente la concentración de 0.5 mg L^{-1} , para las tres secciones utilizadas se obtuvo una considerable formación de callo. Siendo la combinación de hormonas ANA+BAP (0.5 mg L^{-1}) y 2,4-D (0.5 y 0.75 mg L^{-1}) los tratamientos que dan como resultado un callo con características adecuadas para la generación de suspensiones celulares, en las que se encontró viabilidad y crecimiento de biomasa sin diferenciación celular.

Se logró establecer la suspensión celular en *Agave americana L.*, a partir de células meristemáticas, aportando datos importantes como la sección de explante que genere más porcentaje de callo, de igual forma la concentración hormonal adecuada para la generación de suspensiones celulares para esta especie. Dicho protocolo podría ser utilizado como sistema modelo para el estudio de mecanismos de tolerancia, por ejemplo: fisiológicos, metabólicos o genéticos de la especie tratada contra ambientes adversos, las cuales ayudaran a entender mejor los procesos naturales de adaptabilidad que estas presentan.

De acuerdo a que se le ha dado usos medicinales, se podría proponer tipos de estrés para la obtención de los metabolitos secundarios que causan los efectos que alivian las variaciones de enfermedades a las que son aplicadas las especies de Agaves. Como también los de interés para otras aplicaciones en los campos industriales por ejemplo: agrícolas, textiles, alimenticias, cosméticas, farmacología, etc.

XI. RECOMENDACIONES

Continuar esta investigación hasta lograr la obtención de callo por lo menos con un 95% de generación, con poca o sin presencia de formación de embriones. Para esto es necesario seguir probando diferentes concentraciones de hormonas.

Para la generación de células en suspensión, debido a que no hubo aumento de biomasa, en literaturas mencionan las diferencias en cuanto a las hormonas auxina y citocinina. Es preferible utilizar la citocinina ya que esta promueve la división celular, por lo tanto, es posible obtener aumento de biomasa. O bien probar con nuevas combinaciones de fitohormonas para analizar los resultados y tener una amplia gama de posibles respuestas.

XII. COMPETENCIAS DESARROLLADAS Y/O APLICADAS

Trabajo en equipo y cooperación, se obtuvo mutua colaboración de todos los compañeros que se encontraban en el área y buena disposición para la realización de las diferentes actividades. Adaptabilidad en cuanto al horario de trabajo y las distintas actividades desempeñadas a lo largo del periodo laborado y responsabilidad laboral.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Sánchez J.C. 2013. Evaluación de tres métodos de reproducción del penco azul (Agave americana). PNAS 15.

Good-Avila, S.V., Souza, V., Gaut, V.S., y L.E. Eguiarte. 2006. Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). PNAS.103 (24):9124-9129.

Pierik, R.L. 1987. In vitro Culture of Higher Plants. Martinns Nighoff Publishers Acad. Publish. Group. Netherlands. 326 p.

Agave. C. Aedo in Castroviejo Bolibar, Santiago & al. (eds.). Flora iberica. Vol. XX. Liliaceae-Agavaceae, 2013. www.asturnatura.com/especie/agave-americana.html

Domínguez M.S., González Ma., Rosales C., Quiñones C., Díaz S., Mireles S., y Pérez E. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género Agave.

L. Szabados., L.A. Mroginski., y W.M. Roca. 1991. Suspensiones Celulares: Descripción, Manipulación y aplicaciones.

Kitto, S. 1997. Comercial micropropagation. Hort Sciencie. 32 (6).

Navarro, S.; Vera. R. 1988. Historia del cultivo de tejidos vegetales. Hurtado, D y Merino, M.(eds). Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. México. p. 15-34.

Ayala L., Trejo S., Villalobos M., Flores M., Tapia L. 2010. Inducción de embriogénesis somática en cultivo *in vitro* de Agave atrovirens. Instituto Politécnico Nacional.

Hussey, G. 1983. *In vitro* propagation of horticultural and agricultural crops. En: *Plant Biotechnology*. Mantell, S. H. and Smith, H. Cambridge Univ. Prensa, Cambridge.

Robert, M.L., Herrera, J.L., Herrera, M.A., Quijano-Ramayo, A. & E. Balám. 2004. Manual for *in vitro* culture of Agaves. Common fund for commodities. United Nations industrial development organization Vienna 2004.

George, E.F. 1993. Plant propagation by tissue culture. The thechnology. Exegetics Ltd. England.

Díaz, M. D. 2017. Las Hormonas Vegetales en las Plantas. Serie Nutrición Vegetal Núm. 88. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 4 p.

Lallana, V.H. y Lallana, Ma. del C. 2003. Manual de prácticas de Fisiología Vegetal. Edición Digital.

Garay A., De la Paz M., García B., Álvarez E.R., Gutiérrez C. 2014. La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis Thaliana*. Madrid, España.

Murray W. Nabors. 2005. Introducción a la Botánica. Editorial Pearson.

Jordán & Casaretto. 2006. Hormonas y reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE. 2011. Agave Americana. Invasive Species Specialist Group (ISSG), IUCN Species Survival Commission.

William M.R., Luis A.M. 1993. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)

Azofeifa A., 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Universidad de Costa Rica.

Said Infante Gil. 2012. Identificación Taxonómica de agaves (*agave spp.*) utilizados para la elaboración de licor comiteco en Chiapas, México.

M. Bänziger, G. O. Edmeades, J. Bolaños. 1997. Relación entre el peso fresco y el peso seco del rastrojo de maíz en diferentes estados fenológicos del cultivo. Agronomía Mesoamericana.

Esqueda M., Coronado M., Hiram A. Fragoso T. 2012. *Agave angustifolia* Haw. Técnicas para el trasplante de vitroplantas a condiciones de agostadero.

García M., Zizumbo V., Martínez T. 2007. Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural. Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Gómez T., Moreno G., Velásquez L., Aguirre M., Aguado S. 2014. Cultivos fotoautotróficos de células vegetales en suspensión: establecimiento y perspectivas de aplicación. Universidad Nacional de Colombia. Avenida Carrera 30 No. 45-03.

XIV. ANEXO (ACTIVIDAD EXTRA)

Efecto del polietilenglicol (PEG) sobre células en suspensión de *Agave americana* L.

Para establecer estrés hídrico en suspensiones celulares se tomó 1 g de peso fresco del mejor tratamiento, las cuales se le adicionó PEG al 15 y al 30% las cuales se mantuvieron en agitación durante 30 días. Para cada tratamiento se hicieron tres repeticiones, como unidad experimental se usó un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio MS adicionado con 0.5 mg L⁻¹ de ANA + 0.5 mg L⁻¹ BA.

Planta *ex vitro* de *Agave americana* bajo riego restringido

Las plantas *in vitro* de *Agave americana* pasaron por un proceso de aclimatación, el cual consistió en pasar las plántulas a vasos de poliestireno (300 mL) con agrolita:peat moss (1:3) con riego constante (30 mL de agua destilada) durante 90 días. Se seleccionaron 12 plantas para cada tratamiento, el primer tratamiento consistió en un riego contante (30 mL de agua dos veces por semana), el segundo tratamiento que fue riego restringido consistió en adicionarle 30 mL de agua una vez por semana.

RESULTADOS

Células en suspensión de *Agave americana* bajo estrés hídrico

Cuadro 5. Peso inicial y peso fresco de cada tratamiento

Tratamientos	Peso fresco inicial (g)	Tratamientos	Peso fresco (g)
Peg 30%	1.02a	Peg 30%	0.19a
Peg 15%	1.02a	Peg 15%	0.59b
Testigo	1.01a	Testigo	0.91c

De acuerdo a los resultados obtenidos (Cuadro 5) para el tratamiento con polietilenglicol (PEG) al 30% se notó una baja considerable del peso de las células, que después de 30 días de tratamiento bajó el 81.42% del peso inicial, siendo el de iniciación de aproximadamente 1 g. De igual forma para el tratamiento con PEG al 15% perdiendo el 41.09% de peso inicial (Fig. 16).

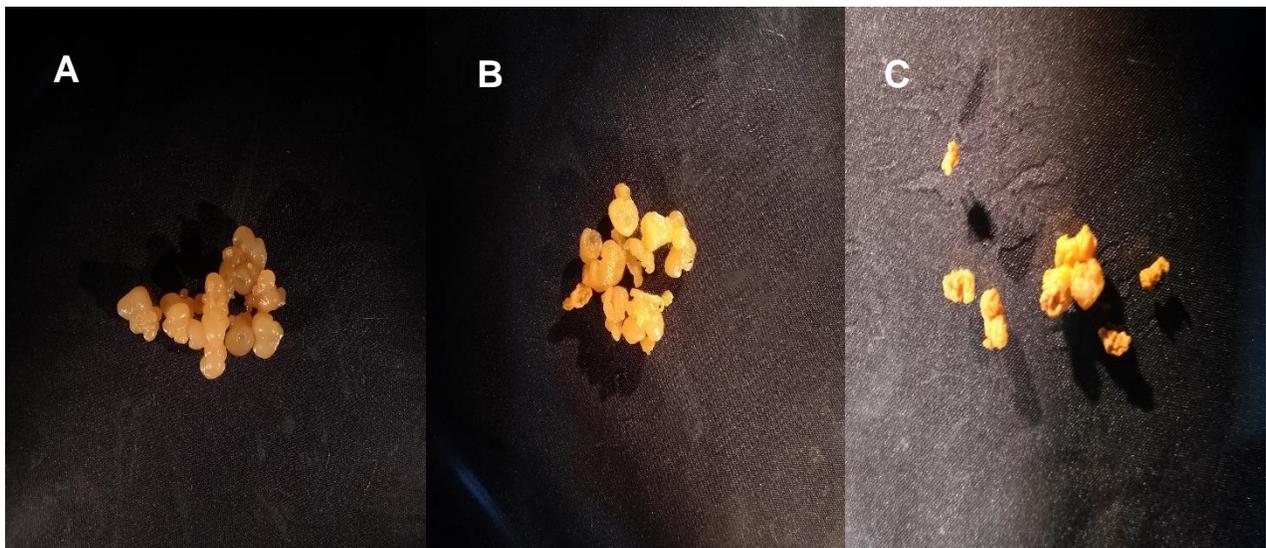


Figura 16. Peso fresco. **A)** Células testigo. **B)** Células PEG 15%. **C)** Células PEG 30%

La pérdida de peso se debió a la cantidad de PEG adicionado en cada tratamiento, teniendo como resultado al tratamiento con más pérdida de peso al que fue adicionado 30% de PEG, seguido del tratamiento 15% de PEG. Lo que tiene relación con el potencial hídrico, ya que mientras más cantidad de PEG se esté adhiriendo al medio menos es el potencial hídrico, es decir que la energía libre del agua es menor. Un cierto porcentaje de agua tiende a salir de las células, por lo

tanto la célula busca un ajuste osmótico después de que el agua sale para tener un equilibrio dentro del sistema. Principalmente la pérdida de peso se da por la cantidad de agua que pierden de las células al hacer el ajuste osmótico al adicionar los tratamientos de PEG (Fig. 17).

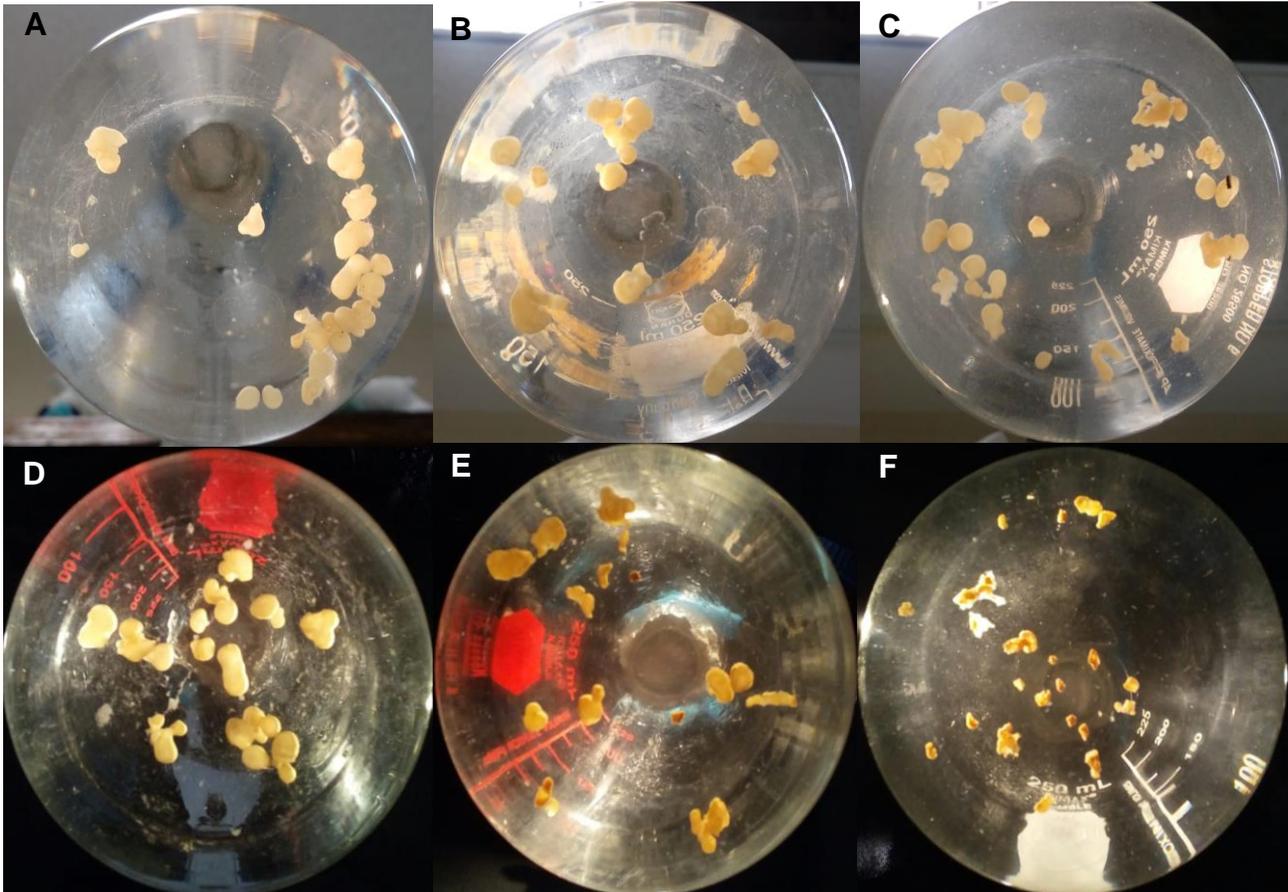


Figura 17. Células en suspensión de *A. americana* L. A) Células Testigo antes de someter a tratamiento. B) Células antes de someter a tratamiento con PEG 15%. C) Células antes de someter a tratamiento con PEG 30%. D) Células Testigo a los 28 días. E) Células con tratamiento PEG 15% a los 28 días. F) Células con tratamiento PEG 30% a los 28 días.

En cuanto a lo obtenido con las células testigo se ve una pequeña pérdida de peso del 9.97% del peso inicial. La pérdida pudo deberse a la manipulación del material vegetal donde probablemente el filtro haya removido esa pequeña cantidad de agua de la célula, ya que no se presentó ningún daño u oxidación en ellas. La causa de que no haya un incremento de biomasa se puede decir que es porque no se le

adiciono una hormona que favorece la división celular como son las citocininas, por lo tanto se puede decir que está se mantuvo constante (Fig. 17A y 17D).

Agave americana bajo estrés hídrico

Cuadro 6. Peso fresco y peso seco de parte aérea y raíz de *Agave americana*.

TRATAMIENTO	Peso Fresco		Peso Seco	
	Gramos			
	Parte Aérea	Raíz	Parte Aérea	Raíz
ESTRÉS	12.9725b	0.346667 ^a	0.7552a	0.086833a
TESTIGO	20.6817a	1.32158b	1.10087b	0.191083b

Después de sacrificar las plantas de *Agave americana*, se pesaron tanto raíces como parte aérea, obteniendo como resultado el peso fresco de ellas (Cuadro 6). Donde nos da a conocer que en los pesos frescos hay una diferencia significativa entre el Tratamiento testigo y de estrés, lo que quiere decir que en el tratamiento de estrés debido a la proporción de agua con la que fueron regadas, las plantas absorbieron una cantidad de humedad menor a los tratamientos testigo, ya que estas últimas se regaron dos veces a la semana, por lo tanto absorbieron la cantidad de agua necesaria para su buen crecimiento. En cuanto a su peso seco de igual forma se obtuvo una diferencia significativa entre tratamiento y estrés, ya que gracias al riego al que se sometieron las plantas testigo, éstas aumentaron un poco más de tamaño que las del tratamiento de estrés, por lo tanto se obtuvo más cantidad de material vegetal seco en plantas testigo, es decir que se presenta una mayor cantidad de peso seco ya que la planta mediante va creciendo se vuelve más fibrosa ya que aparecen los materiales estructurales como las ligninas y las hemicelulosas (Bänziger et al. 1997). Sucediendo lo mismo para los pesos frescos y secos de las raíces con diferencias significativas entre tratamientos testigo y estrés.

En cuanto a lo observado en las plantas a los 120 días de tratamiento, se vio un cambio de textura en las plantas sometidas a estrés, ya que se notó una inclinación en ellas (Fig. 18), debido a la perdida de turgencia, misma que tuvo que ver con el riego al que fueron sometidas, lo que quiere decir que el fluido de agua puesto a

que fue menor, no ejerció presión hacia afuera de la pared celular, dando como resultado el fenómeno contrario de turgencia, conocido como plasmólisis.



Figura 18. Tratamientos. **A)** Testigo **B)** Estrés.

Cuadro 7. Longitud de parte aérea y raíz de *Agave americana* en tratamiento.

TRATAMIENTO	ALTURA (Cm)	
	Parte Aérea	Raíz
ESTRÉS	15.6917 ^a	20.9727a
TESTIGO	16.25 ^a	26.7818b

En la altura de la parte aérea para los dos tratamientos no se obtuvo diferencia estadística ya que en ambos se seleccionó una hoja al empezar el tratamiento, al final del tratamiento en esas hojas se encontró un pequeño alargamiento, pero no tanto a comparación de las hojas centrales las cuales tuvieron una elongación mayor. En las raíces si hubo diferencia estadística, ya que se observó un

alargamiento en las plantas testigo (Fig. 18A), y en las plantas bajo estrés se puede decir que se mantuvo el tamaño de raíz.

Cuadro 8. Cantidad de clorofila en *Agave americana* en tratamiento.

TRATAMIENTO	CLOROFILOMETRO
	Unidades SPAD
TESTIGO	78.0306a
ESTRÉS	78.0986a

El proceso de fotosíntesis ayuda a que la planta presente un pigmento denominado clorofila, además de la formación de productos como son la glucosa y el oxígeno, y en la clorofila se lleva a cabo la absorción de los elementos necesarios para que se lleve a cabo la fotosíntesis. Cabe señalar que el proceso se lleva a cabo a partir de la captación de energía, dióxido de carbono, sales minerales y agua. Este último es de gran importancia ya que lleva a cabo la reacción que conlleva la reducción de la molécula de CO₂ con los electrones extraídos del agua, que a su vez se oxida a O₂ y se libera a la atmosfera, incorporándose el CO₂ reducido al metabolismo celular en forma de Glucosa. Debido a que el estrés al que se sometió la planta *Agave americana* fue el riego restringido, tuvo que ver con los resultados obtenidos ya que no hubo diferencia significativa entre plantas testigo y estrés, ya que la cantidad de clorofila se mantuvieron en el mismo rango, y hablando únicamente del agua, esto se debió a la capacidad equilibrada que tiene el género *Agave* su retención y permitir el drenaje necesario (Esqueda et al. 2012), de igual forma la agrolita contenida en el peat moss donde se encontraba la planta ayudó a la retención de agua ayudando al equilibrio mencionado anteriormente, permitiendo la cantidad de agua necesaria para dichos procesos que conllevaron a obtener aproximadamente la misma cantidad de clorofila.