

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

"EFECTO DE AGENTES GELIFICANTES EN  
EL CULTIVO IN VITRO DE VID  
(*Vitis vinifera* cv. Málaga roja)".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
INGENIERO AGRICOLA  
P R E S E N T A :  
RUBEN URBINA PASTOR

ASESOR: ING. FRANCISCO CRUZ PIZARRO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



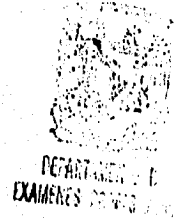
UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .



AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:  
"Efecto de agentes gelificantes en el cultivo in vitro de vid (*Vitis vinifera* c.v. Málaga roja)".

que presenta el pasante: Rubén Urbina Pastor.  
con número de cuenta: 8608410-9 para obtener el TITULO de:  
Ingeniero Agrícola.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 5 de Julio de 1996

PRESIDENTE	<u>Biol. Elva Martínez Holguín</u>	
VOCAL	<u>Ing. Francisco Cruz Pizarro</u>	
SECRETARIO	<u>Ing. Guillermo Basante Butrón</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Ing. Roberto Guerrero Agama</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Ing. Manuel Chávez Bravo.</u>	 5 JUL 96

## **RECONOCIMIENTOS**

**A la Biol. Elva Martínez Holguín.**

**Al Ing. Francisco Cruz Pizarro.**

**Al Ing. Guillermo Basante Butrón.**

**Al Ing. Roberto Guerrero Agama.**

**Al Ing. Manuel Chávez Bravo.**

**A todos ustedes por su apoyo, comentarios y asesoramiento en la realización del presente trabajo. Gracias!**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Señor**

**A mi mamá:** - por su incomparable amor.  
- por ser un gran ejemplo de lucha con su entrega y determinación.  
- por su sabia paciencia al apoyar mi formación.  
- por TODO!

**A Olga:** por su amor y comprensión.

**A mi familia:** por ser como son.

**A mis amigos:** por esos inolvidables momentos.

**Al Biólogo Rubén Pérez Ishiwara:** por su amistad y apoyo incondicional.

**A la UNAM:** por haber participado en mi formación.

## **DEDICATORIA**

**A mi madre!**

## **CONTENIDO.**

<b>INDICE DE CUADROS.</b>	<b>I</b>
<b>INDICE DE GRAFICAS.</b>	<b>II</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>III</b>
<b>I.- Introducción.</b>	<b>1</b>
<b>II.- Revisión Bibliográfica.</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Origen e Historia.</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Morfología.</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Clasificación taxonómica</b>	<b>5</b>
<b>2.4. Situación actual del cultivo.</b>	<b>5</b>
<b>2.5. Propagación de vid.</b>	<b>8</b>
<b>2.5.1. Métodos convencionales.</b>	<b>8</b>
<b>2.5.2. Micropropagación de vid</b>	<b>10</b>
<b>2.6. Generalidades sobre la micropropagación de plantas.</b>	<b>12</b>
<b>2.6.1. Medio de cultivo.</b>	<b>13</b>
<b>2.6.2. Agentes gelificantes.</b>	<b>16</b>

2.6.3. Vitrificación.	20
<b>III- Materiales y Métodos.</b>	<b>22</b>
3.1. Ubicación del experimento.	22
3.2. Establecimiento.	22
3.2.1. Obtención del material vegetal.	22
3.2.2. Obtención de los agentes gelificantes.	23
3.2.3. Medio de cultivo.	24
3.3. Potencial hídrico de los medios.	25
3.4. Diseño experimental.	25
3.5. Toma de datos.	26
3.6. Análisis estadísticos	26
<b>IV.- Resultados y Discusión.</b>	<b>27</b>
4.1. Efecto de los diferentes tipos de agentes gelificantes en explantos de vid.	27
4.2. Efecto de las diferentes concentraciones de agentes gelificantes en explantos de vid.	30
4.3. Interacción de concentración y tipo de agente gelificante en explantos de vid.	34
<b>V.- Conclusiones</b>	<b>36</b>
<b>VI.- Bibliografía.</b>	<b>38</b>



## INDICE DE CUADROS

CUADRO No.		PAG.
1	PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE UVA EN MEXICO.	6
2	TIPO DE EXPLOTACION EN LA VITICULTURA Y VALOR DE LA PRODUCCION	7
3	TRABAJOS SOBRE LA VID EMPLEANDO CULTIVO DE TEJIDOS	11
4	CONTAMINANTES EN TRES TIPOS DE AGAR.	18
5	TRATAMIENTOS PARA EVALUAR EL EFECTO DE AGENTES GELIFICANTES	23
6	MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE Y SKOOG	24
7	EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS EN EXPLANTOS DE VID	31
8	ANALISIS DE VARIANZA DE LA LONGITUD DEL TALLO	32
9	CORRELACION ENTRE LAS VARIABLES	33

## **INDICE DE GRAFICAS**

<b>GRAFICA No.</b>		<b>PAG.</b>
1	<b>LONGITUD DE TALLOS EN BROTES DE VID.</b>	28
2	<b>PORCENTAJE DE HOJAS MODIFICADAS EN EXPLANTOS DE VID</b>	29
3	<b>POTENCIAL HIDRICO DE LOS MEDIOS.</b>	30

## RESUMEN.

En el cultivo de tejidos de la vid (*Vitis vinifera*), así como en las demás especies micropropagadas, se ha empleado el Agar Bacteriológico como agente gelificante para preparar medios sólidos, ya que la bibliografía en general cita que éste provee al medio de un excelente gel húmedo si se utiliza en concentraciones de 0.6% a 0.8%.

Al hacer una revisión de los agentes gelificantes se encuentra que existen diferentes tipos como el Difco Bacto (agar bacteriológico), el Difco Noble, el Difco Purificado, el Gibco Phytagar, el Flow Agar y el Merck Agar - Agar entre otros. El de mayor uso es el Difco Bacto y parece que los criterios que determinan esta condición son la disponibilidad y el costo. Resta mencionar que el tipo y la concentración del gelificante afecta las características físicas y químicas del medio de cultivo, por lo que el crecimiento y desarrollo del material vegetal que a ahí se inocula va a ser alterado.

Por lo anterior, se desarrolló el presente trabajo pretendiendo aportar información sobre el cultivo de tejidos de la vid, específicamente sobre los efectos que pueden tener tres tipos de gelificantes al variar su concentración en el medio de cultivo.

Los gelificantes probados fueron el Agar bacteriológico marca Bioxón, el Agar-Agar (Gum Agar) marca Sigma y el Phytigel (Gellan Gum) marca Sigma. Estos se agregaron al medio de cultivo, -el cual contó con condiciones homogéneas tanto nutricionales como hormonales- para formar nueve tratamientos al variar la concentración (baja, media y alta) de cada gelificante.

El diseño experimental usado para obtener el análisis de varianza fué un Factorial de dos factores con un arreglo completamente al azar.

En base a los resultados obtenidos se tiene que la longitud de los tallos va a incrementarse conforme se disminuye la concentración del gelificante. También se logra este incremento al utilizar gelificantes de mayor pureza. El inconveniente de estos tratamientos es la presencia de vitrificación, la cual se presentó con mayor intensidad en los tratamientos que combinaron menor concentración con mayor pureza del gelificante. Así, se tiene que a pesar de existir diferencias entre los tratamientos en cuanto a longitud se refiere, se recomienda continuar trabajando con el tratamiento testigo por no presentar ninguna alteración por vitrificación, además de tener brotes con longitud aceptable dentro de la micropropagación de esta especie.

## I. INTRODUCCION

El cultivo de la vid en México es de gran importancia desde el punto de vista social y económico. Actualmente ocupa una superficie aproximada de 45,200 hectáreas de las cuales el 98% son de riego; el volumen de la producción es igual a 520,000 toneladas, con lo cual se coloca en noveno lugar en comparación con las demás frutas y el valor de la producción asciende a los 140 millones de dólares (S.A.R.H., 1993).

Este cultivo que ha acompañado al hombre desde sus inicios, ha sido objeto de una gran cantidad y variedad de estudios que tienen por fin común el incrementar la calidad y la cantidad de las producciones. Así, la micropropagación de plantas (también llamada cultivo de tejidos o cultivo in vitro de plantas), que es una técnica relativamente nueva, no se ha quedado al margen y ha contribuido con estudios que van desde la adaptación del cultivo en condiciones in vitro, hasta la obtención de plantas mejoradas genéticamente, entre otros.

El cultivo in vitro consiste básicamente en cultivar sobre un medio nutritivo y en condiciones asépticas, semillas, embriones, órganos, explantos, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores. (Picrik, 1990).

Los medios nutritivos pueden ser líquidos o sólidos, los primeros presentan el problema de aireación del material vegetal, ya que éste queda sumergido, por lo que es necesaria la agitación del medio o bien un soporte como hule espuma, bolas de cristal o papel filtro. Además en estos medios el fenómeno de vitrificación es frecuente. Por lo

anterior los medios sólidos son los de mayor uso, siendo el agar el agente gelificante más común en el cultivo de tejidos. ( Pierik, 1990; Hurtado, 1991).

El agar provee al medio un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo, permite solidificar el medio y formar un complejo coloidal con débil poder de retención iónica. ( Margara, 1988; Hurtado, 1991).

El tipo de agar de mayor uso es el Bacto Agar Difco, pero existen otras formas de agar que van tomando importancia, ya que el tipo de agar y su concentración en el medio afectan el crecimiento y desarrollo del inóculo. ( Debergh, 1983).

El presente trabajo fué desarrollado con el fin de presentar información específica para el cultivo de la vid en condiciones in vitro. Consistió en evaluar tres tipos de agentes gelificantes en tres concentraciones diferentes en un medio conocido, para determinar sus efectos en los explantos de vid.

Los objetivos planteados en la presente investigación son los siguientes:

- Evaluar el efecto de tres tipos de agar a tres diferentes concentraciones en el cultivo in vitro de vid. (*Vitis vinifera* cv Málaga roja).
- Determinar el potencial hídrico de los medios de cultivo.
- Interrelacionar el crecimiento y desarrollo de las plantas in vitro con el potencial hídrico de los medios.

## II.- REVISION BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Origen e Historia.

La vid, *Vitis vinifera*, es una planta originaria de la región del sur del Cáucaso, área comprendida entre el mar Negro y el mar Caspio, en Asia Menor. (Juscáfresa, 1981; Maclás 1993).

Esta planta leñosa ha sido cultivada desde la antigüedad, existiendo testimonios de que los egipcios producían vino desde la IV dinastía, además ha sido citada en pasajes bíblicos desde la época del patriarca Noé.

En México, este cultivo se inicia con la conquista de los españoles, teniendo como primer antecedente histórico las ordenanzas dictadas por Hernán Cortés el 20 de marzo de 1524, las cuales obligaban a toda persona que tuviera esclavos indios a plantar mil sarmientos, bajo la pena de quien no cumpliera podría perder los indios que tuviere a su servicio. A partir de esta fecha el cultivo de la vid ha tenido una historia de altibajos dentro del país ya que para el siglo XVII se logró extender con buenos resultados hasta la Alta California gracias a los jesuitas y franciscanos, pese a la prohibición de los viñedos dictada por la corona en 1592. Con el inicio de los movimientos de independencia los viñedos fueron abandonados y debido al mal tiempo político y a las constantes luchas, éstos permanecieron olvidados durante todo el siglo XIX y principios del XX, siendo hasta 1939,

con el inicio de la segunda guerra mundial, cuando el cultivo recobra importancia, propiciando el surgimiento de la industria vitícola, la cual se sitúa principalmente en los estados de Sonora, Baja California, Coahuila, Aguascalientes y Querétaro. (Gil, 1994).

## **2.2 Morfología.**

La vid es una planta perenne, leñosa, arbustiva, que en estado silvestre crece como una enredadera, su tronco es curvado y puede llegar a medir 30 metros de longitud, su corteza cambia año con año, del tronco salen brotes anuales los cuales después de un estado herbáceo que dura de 4 a 5 meses, se convierten en sarmientos, los cuales formarán los brazos de la vid.

Sus hojas son alternas, simples y pentalobuladas.

Las flores son unisexuales, pentámeras, de cáliz pequeño y se encuentran reunidas en gran número en un eje ramificado, para formar el racimo, en general son pequeñas y de color verde.

El fruto es una baya suave y carnosa, que presenta diferentes colores, formas y tamaños de acuerdo al cultivar que pertenezcan. (Juscafresa, 1981; Marro, 1988; Gil, 1994).



### **2.3 Clasificación Taxonómica.**

La descripción botánica de *Vitis vinifera* es la siguiente: (Larrea, 1980).

Reino.....Vegetal.  
Subreino.....Angiosperma.  
Clase.....Dicotiledónea.  
Subclase.....Coripetalas.  
Orden.....Ranunculales.  
Familia.....Vitaceas.  
Subfamilia.....Ampelideas.  
Genero.....*Vitis*.  
Especie.....vinífera.

### **2.4 Situación Actual del Cultivo.**

La producción de uva en México durante los últimos 10 años oscila entre las 505 mil toneladas en promedio, lo que convierte al país en un productor medio a nivel internacional, aportando el 0.9% de la producción mundial, siendo Italia, Francia, España, Estados Unidos y la ex Unión Soviética los principales productores a nivel mundial con el 55% de la producción total. (S.A.R.H., 1993).

Los principales estados productores de uva en México son: Sonora, Zacatecas, Baja California, Coahuila y Aguascalientes. La superficie que cada estado destina al cultivo y su producción se presenta en el cuadro 1. Cabe mencionar que del total de la superficie reportada para este cultivo el 98% es de riego.

**CUADRO 1. PRINCIPALES ESTADOS PRODUCTORES DE UVA EN MEXICO**

ESTADO	SUPERFICIE (hectáreas)	PRODUCCION (miles de ton)	RENDIMIENTO (ton/ha)
Sonora	28,900	372.0	15.2
Zacatecas	6,000	39.4	7.6
Baja California	5,800	43.1	3.7
Coahuila	2,200	26.9	9.2
Aguascalientes	1,800	18.1	10.2
Otros	500	22.5	-
Total	45,200	522.0	prom. nal. 12.3

Fuente: S.A.R.H., 1993 y 1995.

La explotación que puede tener la vid se clasifica en 4 tipos: uva industrial para aguardiente, uva industrial para la elaboración de concentrados, uva pasa y uva de mesa, el volumen y el valor de la producción se muestran en el cuadro 2.

**CUADRO 2. TIPO DE EXPLOTACION EN LA VITICULTURA Y VALOR DE LA PRODUCCION**

TIPO	PRODUCCION NAL. (toneladas)	VALOR DE LA PRODUCCION (millones de dls.)
Industrial (aguardiente)	286,000	34.7
Industrial (concentrado)	20,000	1.6
Uva pasa	110,000	25.2
Uva de mesa	88,000	83.3
<b>Total</b>	<b>504,000</b>	<b>144.8</b>

Fuente: S.A.R.H., 1995.

Nota: El valor de la producción es sólo para el estado de Sonora en 1994.

Como se puede observar en los datos anteriores, el cultivo tiene una gran importancia tanto económica como social para el país, de acuerdo a la producción reportada, la uva ocupa el noveno lugar en importancia, respecto a las demás frutas.

Para finalizar, se cita la información presentada por productores del estado de Sonora, la cual menciona que para la producción de uva pasa la expectativa es crecer en un 50%, lo cual representa la producción de 3,500 hectáreas. Por otro lado el mismo artículo cita el costo programado para la rehabilitación de viñedos; para reposición de plantas, reposición de viñedos e injertos oscila entre los 20.1 millones de dólares, los cuales cubrirían una superficie aproximada a las 30,250 hectáreas. (S.A.R.H., 1995).

## **2.5 Propagación de la Vid.**

### **2.5.1. Métodos convencionales.**

La vid puede reproducirse por dos vías:

- Vía sexual: Por semilla.
- Vía asexual: Por estacas, acodos e injertos.

La obtención de plantas de vid por vía sexual no es recomendable para establecer plantaciones comerciales debido a que la vid presenta una fecundación cruzada, lo cual no permite conservar los caracteres de la planta progenitora. Por esto la utilización de semillas para multiplicar a esta planta queda reservada a personas interesadas en la investigación de nuevos cultivares.

Por lo anterior, la vía más común para multiplicar a la vid es la vegetativa o asexual, que conserva todas las características de la planta madre, permitiendo obtener plantas idénticas. Los métodos usados son los siguientes:

El estaquillado, consiste en colocar en un medio favorable un trozo de sarmiento de modo que al desarrollar por una parte raíces y por otro lado un sistema aéreo, produzca un vegetal entero.

El acodado consiste en enterrar un sarmiento que permanece unido a la planta hasta que haya reproducido una nueva planta.

En la multiplicación por injerto se debe unir una fracción de sarmiento, llamada injerto, la cual va a ser la encargada de proporcionar la parte aérea, a otra fracción de vegetal llamada portainjerto o patrón, que se va a encargar de producir raíces y dar soporte a la nueva planta.

Estos métodos son los que generalmente se usan en campo, pero presentan ciertas desventajas como son: disponer de plantas que actúen sólo como donadoras de sarmientos, asegurar que dichas plantas estén libres de la presencia de cualquier patógeno (hongo, bacteria o virus), debido a que al propagar material infectado las nuevas plantas estarán contaminadas; el número de plantas que se pueden obtener de una planta madre es limitado al número de sarmientos que se puedan obtener de ésta, teniendo que esperar todo un ciclo de un año para poder obtener nuevos sarmientos de esta planta, así la selección y cuidado de los sarmientos a multiplicar, deben realizarse por personal capacitado; la presencia de Filoxera (*Phylloxera vitifoliae*), así como de otras plagas y enfermedades, limitan la propagación de variedades susceptibles en la zona productora.

El uso de técnicas que superen estos problemas son una necesidad, así la micropropagación de plantas o cultivo de tejidos, actualmente se muestra como una alternativa para los viticultores y en general para cualquier persona implicada con la propagación de plantas. (Chauvet, 1984; Macías, 1993).

### **2.5.2. Micropropagación de vid.**

La micropropagación de la vid se puede realizar utilizando diferentes partes de la planta como explanto para poder iniciar el cultivo de tejidos, así tenemos que se pueden emplear hojas jóvenes, brotes apicales, yemas, segmentos nodales e internodales, óvulos fecundados, embriones inmaduros y semillas. El uso de los tres últimos explantos se limita al mejoramiento genético.

Actualmente podemos encontrar una larga lista de investigaciones realizadas sobre vid empleando la micropropagación, existiendo trabajos que van desde el establecimiento del cultivo en condiciones *in vitro* utilizando diferentes explantos y medios, entre otras variables, hasta aquellos que utilizan las técnicas más sofisticadas cultivando células y protoplastos, logrando obtener plantas mejoradas genéticamente así como nuevos cultivares. En el cuadro 3 se citan algunas investigaciones realizadas sobre la vid.

CUADRO 3. TRABAJOS SOBRE LA VID EMPLEANDO CULTIVO DE TEJIDOS.

AUTOR	AÑO	INVESTIGACION
LUKANINA Y KARAGEZOV	1988	"ASPECTOS DE LA MORFOGENESIS EN DIFERENTES VARIEDADES DE UVA DURANTE LA PROPAGACION MICROCLONAL <u>IN VITRO</u> ."
STAMP, COLBY Y MEREDITH	1990	"ORGANOGENESIS DIRECTA Y REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE HOJAS DE VID".
CORMIER Y CREVIER	1990	"EFECTOS DE LA CONCENTRACION DE AZUCAR SOBRE LA ACUMULACION DE ANTOCIANINAS EN CELULAS EN SUSPENSION DE UVA ( <i>Vitis vinifera</i> )."
HUANG, TAN, LI Y WANG	1990	"PROPAGACION RAPIDA DE UVA <u>IN VITRO</u> , CULTIVANDO BROTES DE MERISTEMO APICAL".
DO Y CORMIER	1990	"AUMENTO EN LA ACUMULACION DE ANTOCIANINAS POR UN ALTO POTENCIAL OSMOTICO EN CELULAS SUSPENDIDAS DE UVA ( <i>Vitis vinifera</i> L)".
ROUBELAKIS	1991	"UN NUEVO MEDIO DE CULTIVO PARA LA RIZOGENESIS <u>IN VITRO</u> DE GENOTIPOS DE UVA PARA VINO".
PRAKASH Y PIERIK	1991	"ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO DE CELULAS SOMATICAS Y REGENERACION DE PLANTAS EN UVA ( <i>Vitis vinifera</i> )."
SUDARSONO Y GOLDY	1991	"EFECTOS DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y POSICION DE LAS YEMAS AXILARES SOBRE EL ESTABLECIMIENTO <u>IN VITRO</u> DE VITIS".
SINGH, SHARMA Y PANDEY	1992	"MULTIPLICACION RAPIDA <u>IN VITRO</u> DE <i>Vitis vinifera</i> L. A TRAVES DE BROTES APICALES Y SEGMENTOS NODALES".
ABRACHEVA Y DIMITROVA	1992	"IMPORTANCIA DEL DIAMETRO DE LOS EXPLANTOS EN EL CULTIVO <u>IN VITRO</u> DE LA VID".

Como se puede observar en el cuadro anterior, la micropropagación o cultivo *in vitro*, puede ser empleado para realizar investigaciones de diferente tipo, por lo que actualmente es considerada una herramienta valiosa. Sus características generales se describen a continuación.

## **2.6. Generalidades Sobre la Micropropagación de Plantas.**

La micropropagación consiste en cultivar en medios nutritivos y en condiciones asépticas porciones de plantas, tales como ápices de tallo y de raíz, primordios de hojas, partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, embriones maduros e inmaduros, segmentos de órganos de tallo y de hoja, entre otros para desarrollar nuevas plantas. (Hartman, 1990; Pierik, 1990; Street, 1977 citado por Hurtado, 1991).

Esta técnica se caracteriza porque:

- Ocurre a micro-escala, sobre una superficie relativamente pequeña.
- Se optimizan las condiciones ambientales, en lo que se refiere a los factores físicos, nutricionales y hormonales.
- Se excluyen todos los microorganismos (hongos, bacterias y virus), así como también las plagas de las plantas (insectos y nemátodos).



- Generalmente no se reproduce el patrón normal de desarrollo de una planta, resultando que un tejido aislado puede dar origen a un callo, o puede desarrollarse de otras formas poco usuales (por ejemplo, formación de órganos y embriogénesis somática).
- La capacidad de cultivar protoplastos o células individuales permite manipulaciones que antes eran imposibles.
- Permite la producción en gran volumen de material sano, de gran vigor y homogeneidad genética, en corto tiempo. En vid se han obtenido en promedio 8,000 plantas por yema en cuatro meses. (Picrik, 1990; Hurtado, 1991).

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

El papel que juega el medio de cultivo en la micropropagación es fundamental para lograr el desarrollo del material a multiplicar, pues el éxito que se tenga en éste, depende en gran manera del uso del medio nutritivo adecuado.

El medio de cultivo es una solución acuosa que está constituida básicamente por agua, sales minerales, carbohidratos, vitaminas, reguladores de crecimiento y agentes gelificantes.

Los nutrimentos son esenciales para el desarrollo de la planta. Sin agua ni sales minerales una planta no puede vivir in vitro o in vivo. Los minerales constituyen el grupo más importante de sustancias nutritivas en el cultivo in vitro. Generalmente se utilizan soluciones madre concentradas para la preparación de los medios nutritivos. Usando las sustancias químicas necesarias y las combinaciones apropiadas de nutrientes, ha sido

posible establecer cultivos para casi todas las partes de una planta en diversas especies vegetales. La fórmula de Murashige y Skoog (1962) es la más usada, ya que ha demostrado que es el medio adecuado para una gran cantidad y variedad de especies, así como para diferentes partes de una planta. La composición de este medio se presenta en el cuadro 6. (Pierik, 1990; Hurtado, 1991).

Los carbohidratos también son importantes en el medio nutritivo por ser esenciales en el crecimiento y desarrollo *in vitro*, ya que el crecimiento tiene lugar en condiciones poco favorables para la fotosíntesis y las plantas en estas condiciones no son completamente autotróficas, además sirven como reguladores osmóticos. La sacarosa es el azúcar universalmente empleado y le siguen en importancia la glucosa, la maltosa, la fructosa, la galactosa, la manosa y la lactosa. (Pierik, 1990; Rosell y Villalobos, 1990).

Las vitaminas son empleadas para estimular procesos de crecimiento específicos, aunque la única que ha demostrado tener importancia en el cultivo de tejidos es la tiamina. El ácido ascórbico se utiliza en altas concentraciones por actuar como antioxidante.

Se denominan reguladores de crecimiento a las hormonas, que son compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores y a los compuestos sintéticos desarrollados por el hombre, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Actualmente se reconocen cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal, divididos en tres grupos: (Hurtado, 1991).

- Promotores del crecimiento: auxinas, citocininas y giberelinas.
- Inhibidores del crecimiento: ácido abscísico.
- Etileno.

En el cultivo de tejidos se utilizan los siguientes tipos:

• **Auxinas:** Generalmente producen elongación celular, expansión de los tejidos, división celular (formación de callo) y formación de raíces adventicias, inhiben la formación de vástagos axilares y adventicios. Las más utilizadas son:

- AIB (Acido indolbutírico).
- AIA (Acido indolacético).
- ANA (Acido naftalenacético).
- 2,4-D (Acido 2,4-Diclorofenoxiacético).
- DCA (Acido paraclorofenoxiacético).

• **Citocininas:** Promueven la división celular estimulando el crecimiento y desarrollo, en concentraciones elevadas inducen la formación de vástagos adventicios, pues disminuyen la dominancia apical, también ayudan en la organización de callos. Las más utilizadas son:

- BA (Benciladenina o 6-bencilaminopurina).
- Cinetina.
- Zeatina.

• **Acido Giberélico:** Promueve la elongación y reprime la formación de brotes de cualquier clase de tejido organizado.

• **Acido Abscisico:** Se utiliza en casos muy especiales, estimula la siucronización durante la embriogenesis en ciertos cultivos; también inhibe el crecimiento. (Pierik, 1990; Rosell y Villalobos, 1990).

Los agentes gelificantes son empleados como soporte para preparar medios sólidos o semisólidos, si no se añade al medio ningún agente gelificante se le denomina medio líquido; este tipo de medio presenta problemas de aireación del material vegetal, ya que queda sumergido, por lo que es necesaria una agitación continua del medio o bien un soporte como hule espuma, bolas de cristal o papel filtro; por otro lado, en los medios líquidos es donde ocurre con mayor frecuencia el fenómeno de vitrificación, el cual aparece especialmente en plantas que disponen de una gran cantidad de agua, debido a esto, los agentes gelificantes continúan teniendo aceptación en el cultivo de tejidos, a pesar de ser uno de los componentes más caros de los medios nutritivos. (Pierik, 1990). Las características de los agentes gelificantes se describen en el siguiente apartado.

### **2.6.2. Agentes gelificantes.**

El agar es el agente gelificante de mayor uso en los medios nutritivos, éste polisacárido de elevada masa molecular, derivado de una alga marina, provee al medio de un excelente gel húmedo (Pierik, 1990). Las ventajas que presenta son: (Rosell y Villalobos, 1990).

- Forma sales que se derriten a 100°C y se solidifican a 45°C, lo cual quiere decir que es estable en todas las temperaturas de incubación.

- No es alterado por las enzimas vegetales.
- No reacciona con los constituyentes del medio.
- No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio.

Generalmente se utiliza el Bacto-Agar (Agar Bacteriológico) en concentraciones de 0.6 a 0.8 %, si se utiliza una concentración más baja el medio permanece sin cuajar, si se utiliza una concentración mayor el medio nutritivo queda muy sólido haciendo difícil la inoculación. (Pierik, 1990).

Existen diferentes tipos de agar, como el Difco Bacto, el Difco Noble, Difco Purificado, el Gibco Phytagar, el Flow Agar y el Merck Agar Agar, entre otros. El de mayor uso es el Difco Bacto-Agar y parece ser que los criterios que determinan esta condición, son la disponibilidad y el costo. (Debergh, 1983).

El tipo y la concentración de agar afectan las características físicas y químicas de un medio de cultivo. (Debergh, 1983).

Las impurezas introducidas con el agar son responsables de diferencias significativas en la concentración de un elemento en medios comparables con diferentes niveles de agar, estas diferencias se detectan por conductividad eléctrica, la cual aumenta conforme se aumentan las concentraciones de agar. La conductividad también aumenta de acuerdo a la pureza del agar, a menor pureza del agar mayor conductividad. (Debergh, 1983).

El agar fisiológicamente no es inerte, puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulantes del crecimiento, estos contaminantes se muestran en el cuadro 5.

Por otro lado, un análisis del fabricante muestra que el Bacto Agar Difco contiene 0.0-0.5 de cadmio, 0.0-0.1 de cromo, 0.5-1.5 de cobre, 1.5-5.0 de hierro, 0.0-0.5 de plomo, 210.0-430 de magnesio, 0.1-0.5 de manganeso y 5.0-10.0 de zinc, (lo anterior en ppm). (Pierik, 1990).

**CUADRO 4. CONTAMINANTES EN TRES TIPOS DE AGAR.**

CONTAMINANTES	BACTO-AGAR	AGAR NOBLE	AGAR PURIFICADO
Cenizas	4.50 %	2.60 %	1.75 %
Calcio	0.13 %	0.23 %	0.27 %
Bario	0.01 %	0.01 %	0.01 %
Silice	0.19 %	0.26 %	0.09 %
Cloruro	0.43 %	0.18 %	0.13 %
Sulfato	2.54 %	1.90 %	1.32 %
Nitrógeno	0.17 %	0.10 %	0.14 %

Fuente: Pierik, 1990.

Otra alteración que puede provocar la concentración y tipo de agar es el estres hidrico, el cual no sólo afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas en condiciones naturales, sino también en el cultivo de tejidos. Bouniols (1974), demostró que la prolina (aminoácido utilizado para determinar el estres hidrico), se encuentra en concentraciones más elevadas en un medio sólido que en un líquido. Resultados preliminares del cultivo de

alcachofas en la fase de propagación mostraron un 20% de incremento de prolina entre el medio con 6 g/l y 11 g/l de Difco Bacto-Agar. (Debergh, 1983).

Además, la utilización del agua es influenciada por la solidez de los geles. En el caso de las concentraciones comúnmente utilizadas de 10 g/l, el trabajo que se ejerce varía por mucho 42 J entre el Difco Bacto/ Difco Noble y Gibco Phytagar/Merck Agar Agar. Este es un fuerte argumento para animar a los cultivadores de tejidos a comparar la marca y tipo de agar usado. (Debergh, 1983).

Otras alternativas al agar que pueden ser utilizadas en el cultivo de tejidos son las siguientes: (Pierik, 1990).

- Polimeros sintéticos, como el Biogel P200 (pildoras de poliacrilamida).
- Alginatos, para el cultivo de protoplastos vegetales.
- Gelrite, agente gelificante altamente purificado.

El uso de estos sustitutos del agar queda limitado al cultivo de células y protoplastos, ya que son productos con mayor pureza y por lo tanto de mayor costo.

Aunado a lo anterior, se tiene que aún utilizando agentes gelificantes se presenta el fenómeno de la vitrificación. Como se mencionó, este fenómeno es más frecuente en medios líquidos y en los medios sólidos se le relaciona con una baja concentración de agar.

El incremento en la concentración de agar evita la vitrificación de tejidos cultivados, pero resulta en una disminución drástica en el radio de propagación (el número de brotes y yemas macroscópicamente visibles al final del periodo de cultivo por el número de inicio). (Brown et al, 1979 citado por Debergh, 1981; Debergh, 1983).

### 2.6.3. Vitrificación.

La vitrificación es una condición fisiológica que también se le conoce como: translucidez, hiperhidratación, transformación hiperhídrica, encharcamiento o vitrosidad. Esta se presenta cuando las plantas disponen de una gran cantidad de agua, como ocurre en los medios líquidos o en aquellos en donde la concentración de agar es baja. (Pierik, 1990).

La presencia y grado de vitrificación está influida por muchos factores complejos como: (Pierik, 1990).

- La concentración de agar, aumentando la concentración se disminuye la vitrificación.
- El tipo de agar, algunos son más susceptibles para que aparezca este fenómeno.
- Se cree que está relacionada con altos niveles de citokininas en el medio.
- El material joven y tierno es más susceptible a la vitrificación.
- Puede ser promovida por una esterilización demasiado intensa.
- La baja irradiación lumínica y las altas temperaturas la pueden promover.
- En algunos casos, mejorando el intercambio gaseoso del recipiente se puede evitar.

La procedencia del material y el estado de desarrollo de la planta madre al momento de la inoculación no interfiere con la vitrificación. (Debergh, 1981).

En *Prunus* y *Malus spp.* la vitrificación se logró disminuir sometiendo los cultivos a una temperatura de 3-4°C en un cuarto frío, por 3 a 4 semanas. (Boxus, et al. 1978, en Debergh, 1981). En este tratamiento el BA fue omitido y las hojas fueron removidas. Con un tratamiento similar se trató a la alcachofa (*Cynara scolymus*) sin tener resultados positivos. (Debergh, 1981).



El volumen de aire, en relación con el intercambio gaseoso, parece no tener relación con la vitrificación. (Debergh, 1981).

De la relación, alta concentración de agar-menor vitrificación, se cree que es debida a una baja disponibilidad de citokinina, el regulador de crecimiento de la planta más usado para desarrollar el radio de propagación. Sin embargo, se encontró que la kinetina es igualmente distribuida en el medio, sin importar la concentración de agar. (Debergh, 1983).

En otras especies como *Prunus*, *Malus*, *Ficus* y *Dianthus*, la frecuencia de la vitrificación puede ser reducida por el abatimiento de la concentración de citokininas en un medio con un contenido "normal" de agar. En *Oreopanax nymphaeifolium* el incremento de la concentración de BA aumenta la frecuencia de la vitrificación en un medio con 6 g/l de Difco-Bacto Agar. (Debergh, 1983).

Otra forma de reducir la frecuencia de la vitrificación puede ser la utilizada por Quoirin y Lepoivre (1977) en sus cultivos de *Prunus*, ellos reemplazaron de la formulación original del medio de Murashige y Skoog las macrosales por unas que no contienen iones de Cl<sup>-</sup>, éste es el medio de Lapoivre. La misma modificación hecha por Debergh en su medio para cultivar alcachofas quedó sin efecto positivo o negativo sobre el crecimiento en general y la vitrificación en particular. (Debergh, 1981).

Para Debergh, el agar es el componente responsable de la matriz potencial hídrica del medio y ésta a su vez es la responsable del fenómeno de vitrificación. Así la única manera de superar la vitrificación consiste en aumentar el contenido de agar en el medio, pero deberá tomarse en cuenta el efecto colateral de la disminución del radio de propagación. (Debergh, 1981).

### **III.- MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Ubicación del Experimento.**

El presente trabajo fué desarrollado en el laboratorio de cultivo de tejidos de la carrera de Ingeniería Agrícola de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Dentro de la cátedra de "Tecnología e Investigación en Micropropogación Vegetal".

#### **3.2. Establecimiento.**

##### **3.2.1 Obtención del material vegetal.**

Las plantas que se utilizaron como explanto, fueron proporcionadas por el mismo laboratorio de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, las cuales se obtuvieron a partir del cultivo de yemas laterales. De estas plántulas *in vitro* fueron removidas las hojas viejas, dejando sólo las hojas jóvenes. Cada explanto sembrado en un tubo de ensaye con aproximadamente 10 ml de medio, contó con 3 yemas axilares distribuidas en una longitud promedio de 3 cm.

### 3.2.2. Obtención de los agentes gelificantes.

Los agentes gelificantes con los cuales se trabajó son: Agar Bacteriológico marca Bioxón, Agar-Agar; (Gum Agar) marca Sigma y Phytigel (Gellan gum, agar substitute gelling agent) marca Sigma. Estos también fueron obtenidos del laboratorio de cultivo de tejidos de la carrera de Ingeniería Agrícola. Las concentraciones que se emplearon fueron para cada tipo de agar: baja, media y alta. Cabe mencionar que se consideraron las características específicas de cada agente gelificante, por lo que su concentración en el medio varió independientemente de los tratamientos. La cantidad empleada de cada tipo de agar se presenta en el cuadro 5.

**CUADRO 5. TRATAMIENTOS PARA EVALUAR EL EFECTO DE AGENTES GELIFICANTES**

TRATAMIENTO	AGENTE GELIFICANTE	CONCENTRACION	
1	Agar Bioxon	1	(4g/l)
2*	Agar Bioxon	2	(6g/l)
3	Agar Bioxon	3	(8g/l)
4	Agar-Agar	1	(2g/l)
5	Agar-Agar	2	(4g/l)
6	Agar-Agar	3	(6g/l)
7	Phytigel	1	(2g/l)
8	Phytigel	2	(3g/l)
9	Phytigel	3	(4g/l)

- Notas: - Concentraciones: 1 = baja; 2 = media; 3 = alta.  
- Para las concentraciones en cada tipo de agente gelificante en el medio se tomó en cuenta las características específicas de cada uno de ellos.  
- \* El tratamiento 2 es el tratamiento testigo.

### 3.2.3. Medio de cultivo.

Para la preparación del medio de cultivo se tomaron como base las sales minerales del medio de Murashige y Skoog (M.S.) al 50% de su concentración, suplementándose con BA y AIB en concentraciones constantes. La fuente de carbohidratos fué el azúcar en una concentración de 30 g/l para todos los tratamientos. La composición del medio de cultivo se observa en el cuadro número 6.

CUADRO 6. MEDIO DE CULTIVO DE MURASHIGE Y SKOOG.

MACROELEMENTOS (mM/l)		MICROELEMENTOS ( $\mu$ M/l)	
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	20.6	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	100
$\text{KNO}_3$	18.3	$\text{H}_3\text{BO}_3$	100
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.0	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	30
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5	KI	5
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.25	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
$\text{Na}_2$ - EDTA	100.0 $\mu$ M/l	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{FeO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100.0 $\mu$ M/l	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.1
<b>COMPUESTOS ORGANICOS</b>			
Myo-inositol	100.0 mg/l	Tiamina	0.1 mg/l
Ac. Nicotínico	0.5 mg/l	Glicina	2.0 mg/l
Piridoxina	0.5 mg/l	Sacarosa	30.0 g/l

Fuente: Gamborg y cols. 1976.

### **3.3. Potencial Hídrico de los Medios.**

Para obtener el potencial hídrico de los medios, se hicieron mediciones con un microvoltímetro (thermocouple psychrometer, tipo Wescor modelo HR-33T, con cámaras de prueba C-52). Este aparato fué facilitado por personal del Centro de Ecología (IBUNAM). Cada muestra de los medios fué colocada en el contenedor de la cámara dejándolas reposar aproximadamente 30 minutos para estabilizarlas. El microvoltímetro fué usado en el modo de punto de rocío (dew point). El potencial hídrico del medio se determinó después de aplicar 10 segundos de refrigerante. El punto de rocío de la cámara fué calibrado con agua destilada y cloruro de sodio, este último en concentraciones de 500mM y 1000mM. La temperatura fué ajustada a 25°C.

### **3.4. Diseño Experimental.**

El diseño experimental empleado fué un Factorial de dos factores con un arreglo completamente al azar. Este comprendió 9 tratamientos con 10 repeticiones cada uno en condiciones homogéneas (temperatura, luz, pH). Cada tubo representó una unidad experimental.

### **3.5. Toma de Datos.**

Los datos fueron tomados semanalmente durante todo el experimento, una vez que los explantos fueron establecidos. Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

- Longitud del tallo. Para esta variable se consideró el tallo principal, el cual fué medido a partir de su base, sin tomar en cuenta el tejido calloso.
- Grosor del tallo. También fué considerado sólo el tallo principal y de acuerdo a las características de esta variable, se formaron dos grupos: uno que contenía a los tratamientos con grosor menor a 1 mm y el otro que agrupó a los de grosor igual o mayor a 1 mm.
- Presencia de vitrificación. Para esta variable se tomó en cuenta la apariencia de las plántulas, las cuales sufrieron alteraciones principalmente en las hojas modificando su tamaño y grosor.

### **3.6. Análisis Estadísticos.**

Para explicar el efecto de los agentes gelificantes combinandolos con tres concentraciones diferentes sobre las variables evaluadas, se realizó el análisis de varianza de acuerdo al diseño experimental planteado. La comparación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 0.05 %. Además para explicar la interacción entre las variables se llevó a cabo una correlación entre éstas.

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **4.1 Efecto de los Diferentes Tipos de Agentes Gelificantes en Explantos de Vid.**

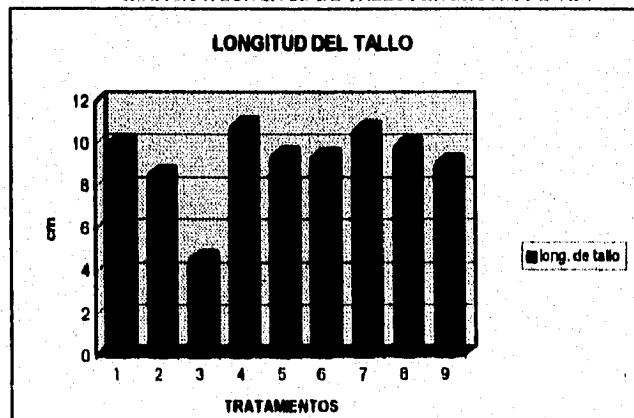
El efecto que se presentó al variar el tipo de agente gelificante en el medio, se puede observar en la longitud de los tallos. En el Agar Bacteriológico se obtuvo la menor longitud en promedio, teniendo que el tratamiento con mayor concentración de este agar reportó la menor longitud de todos los tratamientos con sólo 4.51 cm en comparación con el Agar-Agar que alcanzó 9.31 cm y el Phytigel con 9.03 cm, ambos en sus concentraciones más altas (ver gráfica 1). Esto puede atribuirse a las características de los dos últimos gelificantes, ya que son más puros que el Agar Bacteriológico, por lo cual, se puede pensar que las impurezas introducidas por el Agar Bacteriológico son inhibitoras del crecimiento o bien son responsables de modificaciones tanto físicas como químicas del medio, las cuales no permitieron una elongación mayor de los tallos. (Debergh, 1983) (Pierik, 1990).

Otro dato importante de esta evaluación de agentes gelificantes es la vitrificación. En el Agar-Agar y en el Phytigel se presentó en las tres concentraciones probadas, mientras que en el Agar Bacteriológico sólo se presentó en la concentración más baja. Esto hace pensar que si existen sustancias inhibitoras del crecimiento aportadas por los gelificantes, en este caso principalmente por el Agar Bacteriológico, también pueden ser las responsables de evitar la vitrificación, al no permitir la entrada de estimulantes del crecimiento, los cuales al tener agua disponible en exceso, como es el caso de los otros gelificantes, ocasionan

alteraciones en la planta, principalmente en hojas y tallos. Así, se tiene que por un lado las impurezas del agar no permiten obtener tallos largos en vid, pero tampoco permiten la presencia de vitrificación.

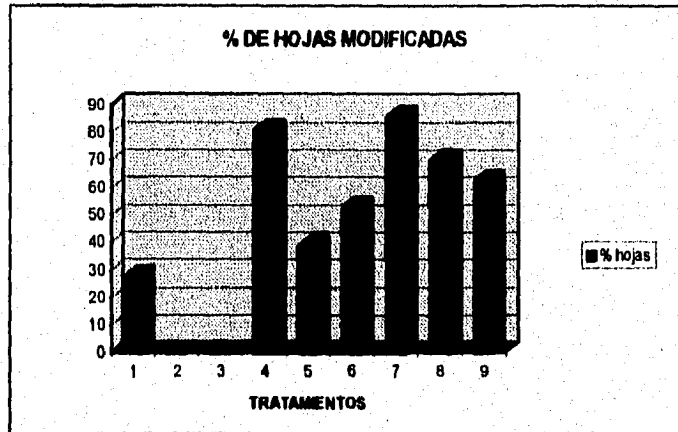
Siendo lo anterior válido, también se puede explicar por qué el Phytigel fué el gelificante que presentó más alteraciones por vitrificación (ver gráfica 2). De los tres gelificantes probados es el Phytigel el de mayor pureza, así que por un lado no aportó sustancias que inhibieran el crecimiento de los explantos y por el otro lado le proporcionó al medio condiciones favorables para que el agua y sus demás componentes pudieran moverse con mayor facilidad, provocando alteraciones, las cuales, a pesar de que disminuyeron conforme se aumentó la concentración de este gelificante, estuvieron presentes durante todo el experimento.

GRAFICA 1. LONGITUD DE TALLOS EN BROTES DE VID.





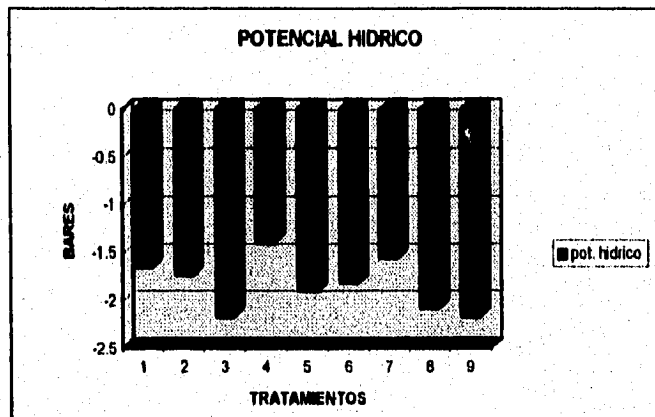
GRAFICA 2. PORCENTAJE DE HOJAS MODIFICADAS EN EXPLANTOS DE VID.



Nota: En el tratamiento 5, sólo el 38.5% de las hojas se modificaron completamente, el resto de las hojas se volvieron más delgadas y grandes sin llegar a sufrir cambios en su forma.

Un factor importante que también debe considerarse respecto a la vitrificación en los tratamientos, es el cambio que sufren los explantos al crecer en otro tipo de gelificante del que estaban establecidos, pues estos se habían adaptado y subcultivado en el Agar Bacteriológico con una concentración constante (la del tratamiento 2, testigo); así, recordando que al cambiar el tipo y la concentración de agar se modifican las características físicas y químicas del medio (Debergh, 1983), se entiende la presencia de vitrificación en tratamientos que, a pesar de contener altas concentraciones de gelificante y reportar un potencial hídrico más bajo en comparación con los tratamientos de menor concentración, sufrieron los efectos de este fenómeno (ver gráfica 2 y 3).

GRAFICA 3. POTENCIAL HIDRICO DE LOS MEDIOS EN BARES.



#### 4.2. Efecto de las Diferentes Concentraciones de Agentes Gelificantes en Explantos de Vid.

Al utilizar diferentes concentraciones de gelificantes en el medio para cultivar explantos de vid in vitro, se obtiene en primer lugar, que la longitud de los brotes va a variar presentándose la relación de que a menor concentración de gelificante - mayor longitud de brotes, esto en los tres tipos de agentes gelificantes. Al aumentar la concentración de los gelificantes en el medio se encontró que los tratamientos respondieron de acuerdo a la relación anterior pero en sentido inverso, es decir, que a mayor concentración-menor longitud de brotes.

Otro efecto evaluado fué nuevamente la presencia de vitrificación en explantos de vid, la cual provocó que las hojas de éstos se modificaran aumentando su tamaño, volviéndose más delgadas y llegando en algunos casos a ser casi traslúcidas. Acompañando a esto, los tallos de los explantos también sufrieron modificaciones, principalmente en su grosor. Los tratamientos más afectados con este fenómeno fueron en general los que contenían menor concentración de agentes gelificantes. En el cuadro 7 se muestran los resultados obtenidos.

**CUADRO 7. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS EN EXPLANTOS DE VID.**

TRAT.	LONG. BROTES (en cm)	% DE HOJAS MODIFICADAS	POTENCIAL HIDRICO (en bares)	GROSOR DEL TALLO*
1	9.98+ ab	27.3	-1.65	D
2	8.53+ ab	0.0	-1.73	G
3	4.51+ b	0.0	-2.16	G
4	10.76+ a	80.8	-1.38	D
5	9.36+ ab	38.5	-1.90	G
6	9.31+ ab	52.6	-1.81	G
7	10.61+ a	85.7	-1.55	D
8	9.84+ ab	70.7	-2.07	G
9	9.03+ ab	62.5	-2.16	G

+Valores con la misma letra son iguales estadísticamente.

C.V. = 42.85%

\* Grosor H < 1 mm. Grosor G > 1 mm.

El análisis de varianza obtenido se presenta en el cuadro 8.

CUADRO 8. ANALISIS DE VARIANZA DE LA LONGITUD DEL TALLO.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F <sub>c</sub>	F <sub>r</sub>
AGAR (A)	2	79.78	39.89	2.69	3.15
CONCENTRACION(B)	2	120.72	60.36	4.07	3.15 *
TRATAMIENTOS (AB)	4	72.33	18.08	1.22	2.53
ERROR	81	1202.60	14.85		
TOTAL	89	1475.45			

\* Diferencia significativa.

Al obtener el ANOVA de los datos del experimento, se observa que estos coinciden con lo observado en el laboratorio, es decir que la concentración en los tratamientos fue la que marcó la diferencia entre estos, teniendo que las concentraciones más bajas promovieron la elongación de los tallos, además de presentar el mayor índice de modificación de hojas y de tallos por la presencia de vitrificación. Esto puede ser explicado si se considera la propuesta hecha por Debergh (1981), donde responsabiliza a la matriz hídrica del medio por la presencia del fenómeno de vitrificación, cita que la única manera de evitarlo es aumentando la concentración del agar. Así, lo sucedido en los tratamientos 1,4 y 7 corresponde a lo anteriormente mencionado, es decir, que estos tratamientos al tener bajas concentraciones de gelificantes tuvieron un potencial hídrico alto (ver cuadro 7), promoviendo la presencia de vitrificación.

Para confirmar lo anterior se hizo una correlación entre la longitud de los tallos contra el potencial hídrico de los medios, obteniendo que ésta es igual a 0.709, lo que significa que existe una alta correlación entre estas dos variables. En el cuadro 9 se muestran los datos obtenidos.

Por otro lado, acerca del comportamiento de los tratamientos restantes, se confirma que siguen el patrón propuesto, ya que a manera que se aumentó la concentración de los gelificantes, se disminuyó la longitud del tallo de los explantos (ver gráfica 1), de los tres tipos de gelificantes, el Agar Bacteriológico fué el que presentó de manera más clara este comportamiento.

**CUADRO 9. CORRELACION ENTRE LAS VARIABLES**

Covarianza = 0.36	Correlación = 0.709
Intercepción = -2.77	Pendiente = 0.105
Error estandar = 0.040	

#### **4.3. Interacción de Concentración y Tipo de Agente Gelificante en Explantos de Vid.**

Una vez que ha sido explicado el efecto de cada una de las variables del experimento sobre los explantos de vid, resta presentar como interactuaron entre sí. El comportamiento que se presentó durante el experimento por parte de los gelificantes con sus diferentes concentraciones fué el siguiente: conforme se disminuyó la concentración y se aumentó la calidad del gelificante, se incrementó la longitud de los brotes; en sentido contrario, al aumentar la concentración y disminuir la calidad del gelificante, se disminuyó la longitud. A primera vista, esto parece sencillo y de fácil aplicación, pero en realidad esto no es así, pues como se ha mencionado anteriormente, el fenómeno de vitrificación se presentó en todos los tratamientos que contenían a los gelificantes que se probaron por primera vez y en el agar testigo con la concentración más baja (ver gráfica 2), siendo los tratamientos 2 y 3 los únicos en no presentar dicho fenómeno. Por otro lado al analizar estadísticamente los datos y realizar la prueba de la diferencia significativa más honesta de Tukey al 0.05% entre los promedios de cada tratamiento (ver cuadro 7) se obtiene que los tratamientos 4,7,1,8,5,6,9 y 2 (orden arreglado de los promedios), son estadísticamente iguales al no existir una diferencia significativa, siendo el tratamiento 3 el único diferente al presentar la menor longitud. Así por un lado, se tiene que aparentemente el usar otros tipos de gelificantes en medios con igual contenido nutricional y hormonal, provoca longitudes mayores de los brotes, lo cual es una característica deseable en la micropropagación de vid, pero por el otro,

estos mismos agentes gelificantes causan alteraciones en hojas y tallos volviéndolas delgadas, casi traslúcidas a las primeras y frágiles a los segundos, lo cual es indeseable por dificultar subcultivos posteriores in vitro o adaptaciones ex vitro de las plantas.

Con esto, de acuerdo con los datos presentados, lo indicado por el momento es continuar trabajando con el testigo (tratamiento 2), ya que, a pesar de haber ocupado el penúltimo lugar en cuanto a longitud de brotes se refiere, éste no presentó ninguna alteración en hojas o en tallos y estadísticamente es igual a los demás tratamientos.

Cabe aclarar que lo anterior no quiere decir que el trabajar con otros gelificantes no represente ningún cambio positivo al micropropagar explantos de vid, ya que al observar que la tendencia de estos gelificantes es incrementar la longitud de los brotes, se hace recomendable continuar evaluándolos, tomando en cuenta que al cambiar repentinamente el gelificante en el medio, pueden ocasionarse cambios tanto físicos como químicos en este último, provocando que el material ahí propagado, responda de diferente manera, llegando a presentarse efectos no deseados en la micropropagación.

## V. CONCLUSIONES

1. Al usar agentes gelificantes de diferente tipo y calidad para solidificar medios de cultivos, se modifican las características de estos últimos, teniendo como resultado que el material cultivado se desarrolle de diferentes maneras.
2. El potencial hídrico de los medios de cultivos está relacionado directamente con la concentración del gelificante, a menor concentración-mayor potencial, de manera inversa a mayor concentración - menor potencial.
3. Cuando el potencial hídrico del medio es alto se favorece la presencia de vitrificación, para evitar este fenómeno se aumenta la concentración del gelificante, pero se afecta el radio de propagación; en vid se aprecia este efecto en los brotes los cuales presentan menores longitudes de tallo.
4. La vitrificación se puede presentar cuando el medio de cultivo presenta un potencial hídrico alto o bien cuando las características del medio facilitan el movimiento del agua hacia dentro del material vegetal propagado.
5. El cambio repentino de agente gelificante también puede ser responsable de la presencia de vitrificación, aún teniendo concentraciones altas de éste.



6. Conforme se aumenta la calidad del agente gelificante, se obtienen longitudes mayores en brotes de vid cultivados in vitro. Por lo que las impurezas aportadas por el Agar Bacteriológico pueden ser las responsables de que se disminuya la longitud de los brotes de vid en los tratamientos que contenían a dicho gelificante.

7. La presencia de vitrificación en el presente experimento se debió a un aumento en la disposición de agua en el medio, lo cual fué promovido por bajas concentraciones de gelificante y/o gelificantes de mayor pureza. Los efectos de este fenómeno en vid se aprecian en las hojas al modificar su grosor y tamaño (estas se vuelven más grandes y delgadas llegando a ser casi traslúcidas) y en los tallos, los cuales presentan diámetros menores a 1 mm. Los tratamientos que presentaron mayor índice de vitrificación fueron los que combinaron nuevo tipo de agar con la menor concentración de éste en el medio.

8. Dado que el tratamiento testigo no presentó ningún problema con vitrificación y estadísticamente es igual que los tratamientos con mayor longitud, se recomienda seguir utilizándolo para propagar explantos de vid, en lo que se realizan nuevas pruebas de los agentes gelificantes disponibles.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## BIBLIOGRAFIA

- Abracheva, P. et al. 1992. "Importance of explant diameter in in vitro culture of vine".  
Comptes - Rendus. de - L' academie - Bulgare des Science. 45: 12. pp 125-128.
- Amirato, P.V. et al. 1990. "Handbook of plant cell culture".  
MacGraw-Hill Publishing Company. N.Y. U.S.A. 819 p.
- Colmier, F. Crevier, H. 1990. " Effects of sucrose concentration on the accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspension". Canadian Journal of Botany.  
68 : 8. pp 1822 - 1825.
- Cruz, P. F. 1983. "Propagación in vitro de manzana (*Malus plumilla* Mill)".  
Tesis. U.N.A.M. F.E.S. Cuautitlán, Estado de México. 68 p.
- Debergh, P. et al. 1981. "Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*):  
Evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential". Physiol. Plant. 53. pp 181-187.
- Debergh, P. 1983. "Effects of agar brand concentration on the tissue culture medium".  
Physiol. Plant. 59. pp 270-276.
- Do, C. y Cormier, F. 1990. "Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. Plant-Cell-Report. 9 : 3.  
pp 143 - 146

- Gamborg, O.L., Murashige T. et al. 1976. "Plant tissue culture media in vitro".  
pp 473 - 478.
  
- Gil, R. J. 1994. "La explotación agrícola y la decadencia de la vid (*Vitis vinifera*) en el Estado de Aguascalientes". Tesis. U.N.A.M. F.E.S. Cuautitlán, Estado de México. 142 p.
  
- Hartmann, H.T. 1990. "Plant propagation, principles and practices".  
Printice-Hall, Inc. Printed in U.S.A. pp 541 - 544.
  
- Huang, Z. et al. 1990. "In vitro propagation and shoot apical meristem culture of grape". *Journal of Fruit Science*. 7: 1. Pp 13 - 18.
  
- Hurtado, M. D. y Merino, M.M. 1991. "Cultivo de tejidos vegetales".  
Trillas. México, D.F.
  
- Juscafresa, S. B. 1981. "Cultivo de la vid".  
AEDOS. Barcelona, España. 136 p.
  
- Kyte, L. 1987. "Plants from test tubes".  
Timber Press Inc. Portland, Oregon. 160 p.
  
- Macías, H. M. 1993. "Manual práctico de viticultura".  
Trillas. México, D.F. 112 p.
  
- Margara, J. 1988. "Multiplicación vegetativa y cultivo in vitro".  
Mundi-Prensa. Madrid, España. 232 p.
  
- Marro, M. 1989. "Principios de viticultura".  
CEACSA. Barcelona, España. 207 p.

- Pierik, R.L.M. 1990. "Cultivo in vitro de las plantas superiores".  
Mundi-Prensa. Madrid, España. 324 p.
- Prakash, J. y Pierik, R.L.M. 1991. "Horticulture, new technologies and applications"  
Kluwer Academic Publishers. Printen in the Netherlands. pp 249 - 254.
- Rosell, H. C. y Villalobos, A V. 1990. "Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales". FAO. Roma, Italia. 112 p.
- Roubelakis. et al. 1991. "A new culture medium for in vitro rhizogenesis of grapevine (*Vitis spp*) genotypes". HortScience 26 : 12. Pp 1551 - 1553.
- S.A.R.H. I.N.I.A. 1980. "Resultados de la investigación vitícola del INIA en México".  
México, D.F. 27 p.
- S.A.R.H. D.G.P.A. 1993. "Estrategia nacional de mediano plazo (1993-1999) de desarrollo y promoción de exportaciones de uva". México, D.F. 41 p.
- S.A.R.H. D.G.P.A. 1994. "Vid datos básicos".  
México, D.F. pp 63-71.
- S.A.R.H. 1995. "La viticultura sonorensis (importancia, problemática y potencialidades)"  
Sonora, México. 16 p.
- Singh, A. Sharma, B. 1992. "Rapid in vitro multiplication of *Vitis vitifera L.* Through shoot tips and nodal segments". Acta Horticultura 321. pp 601 - 605.
- Stamp, J. et al. 1990. "Direct shoot organogenesis and plant regeneration from leaves of grape (*Vitis spp*)". Plant-Cell. Tissue and Organ Culture. 22 : 2. pp 127 - 133.

- Steel, R.G.D. y Torrie J.H. 1988. "Bioestadística. Principios y procedimientos". México, D.F. 622 p.
- Sudarsono y Goldy. 1991. "Growth regulator and axillary bud position effects on in vitro establishment of *Vitis rotundifolia*". HortScience 26 : 3. pp 354 - 357.
- Zimmerman, R.H. y Debergh, P. 1991. "Micropropagation technology and applications." Kluwer Academic Publishers. Printen in U.S.A. 469 p.