



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA EN HOJA  
DE PLANTAS MULTIPLICADAS *IN VITRO***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO AGRÍCOLA**

P R E S E N T A

**JOSÉ LUIS NORIEGA NAVARRETE**

**ASESOR: M en C. JUAN ROBERTO GUERRERO AGAMA**

CUAUTITLAN IZCALLI, MEX.

**2010**



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.

*Agradezco a:*

*La Universidad Nacional Autónoma de México,*

*Por otorgarme la formación profesional que hoy empiezo, pero sobre todo por el orgullo de pertenecer a la Máxima Casa de Estudios.*

*Fundación UNAM, al Programa Nacional de Becas para la Educación Superior, y a la Fundación Alberto y Dolores Andrade, I.A.P.*

*Por el apoyo recibido durante mi formación académica y por su confianza otorgada.*

*Mis profesores del Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Naucalpan y de la Facultad de Estudios Superiores Campus Cuautitlan,*

*Por su sabia guía durante estos años, por compartir sus enseñanzas conmigo y por la instrucción recibida, mismas que me han transformado en un nuevo individuo.*

*Al equipo del laboratorio de Micropropagación, el M. C. Francisco Cruz Pizarro y la Pra. Catalina Moreno,*

*Por su apoyo incondicional en el transcurso de mi vida académica y durante la elaboración de esta tesis*

*Muy especialmente al M. en C. Roberto Guerrero.*

*Por sus sabios consejos y sus experiencia  
compartida a través de su amistad, y sobre todo  
por su dirección en el desarrollo de esta tesis.*

*A mis compañeros de la carrera de Ingeniería Agrícola,*

*Por todos los esos momentos que hemos  
compartimos juntos.*

*A todos mis compañeros, colegas y amigos*

*Quienes me han acompañado a lo largo de estos  
años, y cuyos nombres son tantos que no caben en  
una sola hoja de papel, solamente en el corazón.*

*Dedicada a:*

*Mis padres, Juanita y José Luis,*

*Por toda su entrega y dedicación incondicional,  
pero sobre todo por el regalo más grande que me  
dieron: la vida.*

*Mis hermanas, Isabel y Diana,*

*Por todo su apoyo.*

*Mis sobrinos Cristina y Andrés,*

*Para que en el futuro, se conviertan en personas y  
profesionistas exitosos.*

*Mi tía Martha,*

*Con singular cariño por todo su aprecio y  
dedicación.*

*Mis abuelos, Inés (†) y Enrique (†),*

*Por haberme demostrado en todo momento su  
amor y cariño, por haberme inculcado mi  
verdadera vocación, y porque pese a no estar  
presentes, siempre han estado en mi corazón.*

*Belzay,*

*Por toda su ayuda y a apoyo a cada momento.*

*A todo individuo interesado en el quehacer científico en beneficio  
de México.*

*...¿ Canin ye nicca, canin ye nino'ta?  
¿ Cuix ye oncan in inquitotehuahqueh  
Huehqueh tachtohuan, tococolhuan  
in Tochillalpan, in Tonacallalpan?  
¿ Cuix ye oncan in inilhuicallalpan?...*

*Nican Mopohua*

*...¿ Dónde estoy, dónde me veo?  
¿ Acaso allá donde dejaron dicho  
nuestros antiguos antepasados, nuestros abuelos,  
en la Tierra de la Flor, en la Tierra de nuestro sustento?  
¿ Acaso en la Tierra del cielo?...*

*Fragmento Nican Mopohua*

**CARACTERIZACIÓN  
ANATÓMICA EN HOJA  
DE PLANTAS  
MULTIPLICADAS  
*IN VITRO***

# CONTENIDO

<b><u>ÍNDICE DE CUADROS.....</u></b>	<b><u>XI</u></b>
--------------------------------------	------------------

<b><u>ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS.....</u></b>	<b><u>XII</u></b>
---	-------------------

<b><u>RESUMEN.....</u></b>	<b><u>XIII</u></b>
----------------------------	--------------------

<b><u>INTRODUCCIÓN .....</u></b>	<b><u>1</u></b>
----------------------------------	-----------------

<b><u>II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</u></b>	<b><u>4</u></b>
--	-----------------

<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>5</b>
------------------------------	----------

<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>5</b>
------------------------------------	----------

<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>6</b>
-----------------------	----------

<b><u>III. MARCO REFERENCIAL.....</u></b>	<b><u>7</u></b>
---	-----------------

<b>3.1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA .....</b>	<b>8</b>
--	----------

3.1.1. <i>VITIS VINIFERA</i> L .....	8
--------------------------------------	---

3.1.1. <i>SORGHUM BICOLOR</i> (L) MOENCH.....	11
---	----

3.1.1. <i>AGAVE TEQUILANA</i> WEBER CV. AZUL.....	14
---	----

<b>3.2. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LAS HOJAS .....</b>	<b>16</b>
---	-----------

3.1.1. TEJIDO EPIDÉRMICO.....	17
-------------------------------	----

3.1.2. TEJIDO FUNDAMENTAL .....	20
---------------------------------	----

3.1.2.1. Parénquima en empalizada .....	21
---	----

3.1.2.2. Parénquima esponjoso .....	22
-------------------------------------	----

3.1.3. TEJIDO VASCULAR .....	23
------------------------------	----

<b>3.3. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LAS HOJAS DE PLANTAS C-3.....</b>	<b>25</b>
---	-----------

<b>3.4. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LAS HOJAS DE PLANTAS C-4.....</b>	<b>26</b>
---	-----------

<b>3.5. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LAS HOJAS DE PLANTAS MAC.....</b>	<b>28</b>
---	-----------

<b>3.6. CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LAS PLANTAS DESARROLLADAS IN VITRO .....</b>	<b>30</b>
--	-----------

<b><u>IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....</u></b>	<b><u>37</u></b>
---	------------------

<b>4.1. UBICACIÓN DE ÁREA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>38</b>
---	-----------

<b>4.2. MATERIAL VEGETATIVO .....</b>	<b>38</b>
4.2.1. FASE <i>IN VITRO</i> .....	38
4.2.2. MATERIAL EN CONDICIONES NATURALES ( <i>IN VIVO</i> ) .....	40
<b>4.3. OBSERVACIONES MORFOLÓGICAS Y ANATÓMICAS .....</b>	<b>41</b>
4.3.1. OBSERVACIONES MORFOLÓGICAS .....	41
4.3.1.1. Métodos .....	41
4.3.1.2. Parámetros de evaluación .....	42
4.3.2. OBSERVACIONES ANATÓMICAS .....	43
4.3.2.1. Métodos .....	43
4.3.2.2. Parámetros de evaluación. ....	44
<b><u>V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</u></b>	<b><u>47</u></b>
<b>5.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA .....</b>	<b>48</b>
5.1.1. <i>VITIS VINIFERA</i> L .....	49
5.1.2. <i>SORGHUM BICOLOR</i> (L) MOENCH.....	50
5.1.3. <i>AGAVE TEQUILANA</i> WEBER CV. AZUL.....	52
<b>5.2. CARACTERIZACIÓN ANATÓMICA.....</b>	<b>54</b>
5.2.1. <i>VITIS VINIFERA</i> L .....	54
5.2.1.1. Tejido Epidérmico.....	54
5.2.1.1.1. Cutícula.....	54
5.2.1.1.2. Epidermis.....	56
5.2.1.1.3. Estomas.....	57
5.2.1.2. Tejido Fundamental.....	59
5.2.1.2.1. Parénquima en empalizada.....	60
5.2.1.2.2. Parénquima esponjoso .....	60
5.2.1.3. Tejido Vascular. ....	61
5.2.1.3.1. Vena central. ....	62
5.2.1.3.2. Venas secundarias. ....	64
5.2.1.3.3. Venas terciarias. ....	65
5.2.2. <i>SORGHUM BICOLOR</i> (L) MOENCH.....	66
5.2.2.1. Tejido Epidérmico.....	66
5.2.2.1.1. Cutícula.....	66
5.2.2.1.2. Epidermis .....	67
5.2.2.1.3. Estomas.....	67
5.2.2.2. Tejido Fundamental.....	69
5.2.2.3. Tejido Vascular. ....	70
5.2.2.3.1. Vena central. ....	70
5.2.2.3.2. Venas secundarias. ....	72
5.2.2.3.3. Venas terciarias. ....	73
5.2.3. <i>AGAVE TEQUILANA</i> WEBER CV. AZUL.....	74
5.2.3.1. Tejido epidérmico .....	74
5.2.3.1.1. Cutícula.....	74
5.2.3.1.2. Epidermis. ....	75
5.2.3.1.3. Estomas.....	76
5.2.3.2. Tejido fundamental.....	78
5.2.3.3. Tejido vascular .....	78
5.2.3.3.1. Vena central .....	78
5.2.3.3.2. Venas secundarias. ....	80
5.2.3.3.2. Venas terciarias. ....	81

<b>5.3. DIFERENCIAS ANATÓMICAS IN VITRO ENTRE PLANTAS C-3, C-4 Y MAC .....</b>	<b>84</b>
<b>5.4. APLICACIONES AGROBIOTECNOLÓGICAS .....</b>	<b>87</b>
<b><u>CONCLUSIONES .....</u></b>	<b><u>91</u></b>
<b><u>LITERATURA CITADA .....</u></b>	<b><u>94</u></b>
<b><u>ANEXOS .....</u></b>	<b><u>100</u></b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>102</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Relación de cloroplastos entre parénquima en empalizada y esponjoso.....	21
Cuadro 2. Características de hoja de un año de edad en frutos de kiwi mediante el empleo de dos diferentes métodos de propagación. ....	33
Cuadro 3. Cantidad de cera epicuticular ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) en plantas ornamentales producidas <i>in vitro</i> , en invernadero y durante la fase de aclimatación.....	34
Cuadro 4. Grosor de cutícula ( $\mu\text{m}$ ) en hojas de diferentes especies teñidas con Sudán IV. ....	35
Cuadro 5. Diferencias morfológicas entre plantas obtenidas <i>in vivo</i> y multiplicadas <i>in vitro</i> de <i>Vitis vinifera</i> L, <i>Sorghum bicolor</i> (L) Moench y <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul. ....	53
Cuadro 6. Diferencias anatómicas entre plantas de <i>Vitis vinifera</i> L, <i>Sorghum bicolor</i> (L) Moench y <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul obtenidas <i>in vivo</i> y multiplicadas <i>in vitro</i> . ...	82
Cuadro 7. Características anatómicas de plantas con metabolismo C-3, C-4 y MAC multiplicadas <i>in vitro</i> . ....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS

Figura 1. Corte transversal en hoja de <i>V. vinifera</i> L.....	59
Figura 2. Corte transversal en hoja de <i>S. bicolor</i> (L) Moench.....	68
Figura 3. Corte transversal en hoja de <i>A. tequilana</i> Weber cv. <i>Azul</i> . ....	77
Gráfico 1. Grosor de cutícula ( $\mu\text{m}$ ) en hojas de plantas de <i>Vitis vinifera</i> L, <i>Sorghum bicolor</i> (L) Moench y <i>Agave tequilana</i> Weber cv. <i>Azul</i> , desarrolladas en condiciones <i>in vivo</i> y multiplicadas <i>in vitro</i> , teñidas con rojo de aceite 7 B.....	56

# RESUMEN

Los explantes multiplicados *in vitro* presentan inconvenientes durante la fase de aclimatación, debido a las modificaciones fisiológicas que se presentan durante el periodo de incubación, lo cual puede corroborarse en modificaciones que presentan las vitroplantas en comparación con aquellas que se desarrollan en condiciones naturales (*in vivo*). Sin embargo, se tiene poca información al respecto de los cambios que se presentan por efecto de las condiciones en las cuales se desarrollan los explantes, con relación a las plantas obtenidas en un ambiente natural. Por ello, en el presente trabajo se caracterizaron anatómicamente plantas obtenidas *in vitro* y en condiciones naturales de tipo C-3, C-4 y MAC, para lo cual se utilizaron plantas de ambientes adaptados de vid (*Vitis vinifera* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench y de agave tequilero (*Agave tequilana* Weber cv. Azul), mismas que fueron propagadas por medio del cultivo de tejidos vegetales.

Para tener una buena caracterización, se consideraron únicamente las hojas, describiendo morfológicamente los órganos de la planta en microscopio estereoscópico, con las claves morfológicas establecidas por Heywood, (1985).

En general, se encontró que los explantes obtenidos no difieren morfológicamente, en forma significativa de las plántulas obtenidas bajo condiciones *in vivo*, pero anatómicamente se presentaron cambios en la reducción del grosor de la cutícula, modificación en la forma y tamaño celular. Con ello se confirma una interacción del genotipo con el ambiente de desarrollo.

# **INTRODUCCIÓN**

**E**n México, al igual que en el resto del orbe, la biotecnología agrícola ha surgido como una opción sustentable, afrontando el reto de incrementar y mejorar la producción de alimentos consecuente con el incremento de la demanda de los mismos por la población mundial (Herrera, Larqué y Serratos, 2002; Viniegra-Gonzalez, 2005; Bosch 2002).

Es así como la técnica del cultivo de tejidos vegetales se ha utilizado para la obtención de materiales sano, vigoroso y en grandes cantidades, y constituye igualmente una opción sustentable para la productividad agrícola. Para lograr el éxito en ésta técnica, debe considerarse además de obtener morfogénesis y proliferación de los explantes, el establecer las plántulas en condiciones ambientales externas con la finalidad de tener un crecimiento normal, y obtener ventajas económicas en el establecimiento de plantaciones comerciales. Lo anterior se expone debido a que las plantas *in vitro* presentan características anatómicas que limitan su adaptación en un ambiente natural, debido a que, entre otros factores como la aplicación de baja intensidad de luz, elevado porcentaje de humedad relativa, mínima fluctuación térmica y aporte nutrimental adecuado, provocan que las plántulas presenten deficiencias en sus procesos metabólicos (Kim y De Hertogh, 1997); estas características disminuyen la supervivencia en condiciones externas, reportándose tasa fluctuantes del 50 al 90% de arraigo según la especie. Por ello, resulta necesario establecer una fase de aclimatación, donde las plantas puedan normalizar tanto sus estructuras anatómicas como el funcionamiento metabólico de las mismas, que les permitan sobrevivir en el medio externo, -considerando que las raíces producidas por cultivo de tejidos no tienen la capacidad de absorber nutrimentos en forma normal- (Dennis, 1986), el periodo de transición y no

constituya una limitante para el uso comercial de ésta técnica, (Pierik, 1990; Benson 1999), lo cual evitaría que la planta presente un estrés por el nuevo cambio de ambiente, estableciéndose una fase de arraigo, donde las plantas tengan realmente un porcentaje de supervivencia y con ello una vida productiva real, y que a su vez otorguen valor comercial a los productos del campo (Mack, 2009).

Lo anterior, condujo al planteamiento de esta investigación, en la cual se determinaron las características anatómicas en hojas obtenidas *in vitro* de plantas de interés comercial y estratégico como la vid, el sorgo y el agave tequilero, con la finalidad de formular un manejo más adecuado durante la fase de aclimatación, y con ello obtener mayor éxito de sobrevivencia en el terreno definitivo. La información obtenida puede ser aplicable a diversos cultivos, considerando que se estudiaron plantas cuya ruta fotosintética abarca todos los grupos conocidos (C-3, C-4 y MAC).

## **II. OBJETIVOS E**

## **HIPÓTESIS**

### ***Objetivo General***

Caracterizar anatómicamente plantas de tipo C-3, C-4 y MAC, obtenidas *in vitro* y en condiciones naturales (*in vivo*), para determinar las diferencias estructurales como resultado del ambiente bajo el cual se desarrollan, que permitan entender y en su caso determinar un manejo para la aclimatación de las mismas.

### ***Objetivos Particulares***

- ♣ Describir las características morfológicas y anatómicas de plantas multiplicadas *in vitro* e *in vivo*.
  
- ♣ Determinar las diferencias morfológicas y anatómicas de las plantas formadas *in vitro* e *in vivo* para establecer parámetros de adaptación durante la aclimatación.
  
- ♣ Analizar las diferencias anatómicas entre plantas de metabolismo C-3, C-4 y MAC obtenidas *in vitro* y las desarrolladas bajo condiciones normales.

## ***Hipótesis***

Las condiciones ambientales en las cuales se desarrollan las plantas generan alteraciones fisiológicas que pueden conllevar a cambios en la anatomía de los individuos, por tanto, al comparar la anatomía de plantas obtenidas *in vitro*, contra las plantas desarrolladas bajo condiciones naturales, resultarán evidencias de la influencia de los factores ambientales en las características anatómicas de cada especie en particular.

# **III. MARCO**

# **REFERENCIAL**

### ***3.1. Descripción botánica***

#### ***3.1.1. Vitis vinifera L***

La vid o uva, es arbusto sarmentoso y trepador, aunque puede considerarse como una liana, el cual se fija a tutores naturales o artificiales, ya sea cuando crece de forma natural o bien cuando se trata de un cultivo respectivamente.

La raíz de la vid es de tipo pivotante cuando procede de semilla, y de tipo fasciculada cuando se multiplicada por estacas, presentando en este caso varias raíces principales; éstas tienen una longitud variable entre 1.8 y 3.6 m, aunque Tico (1978) reporta profundidades mayores. Sin importar el origen de la raíz principal, los arbustos de vid presentan un sistema radical ampliamente ramificado, constituido por innumerables raicillas de tamaño moderado, las cuales constituyen pelos absorbentes de la raíz y que, según lo reportado por Winkler (1981) llegan a presentar hasta 476 pelos por centímetro lineal de raíz.

Según Tico (1978), la parte aérea de la vid esta constituida básicamente por el tronco y los sarmientos. El primero es el soporte leñoso, comprendido desde el ras del suelo y constituido por madera vieja de color mate; mientras que los sarmientos, son las ramas jóvenes, constituidas por madera nueva, de 1 año de edad, desarrolladas en el verano, de color verde en su primera etapa, tornándose a tonalidades beige, gris, amarillo, rojo, marrón o pardo, según la especie y la variedad, y una longitud reportada de ocho hasta diez metros, limitada generalmente por el manejo agronómico entre uno y dos metros de largo (Hidalgo, 1981), con un grosor promedio de 8 a 30 mm, con forma casi cilíndrica. De cada

nudo nace una yema principal y otras dos mas pequeñas llamadas ciegas o yemas alternas; éstas pueden ser por su posición terminales o laterales, en cuyo caso se encuentran alternadas y opuestas, con una divergencia de 180°, y puede ser prontas (cuando están próximas a brotación) o latentes (cuando aún no se han desarrollado).

Respecto a la hoja, la lámina foliar presenta cinco nervaduras principales que van a cada uno de los lóbulos, ramificandose en secundarias y terciarias hasta conformar una red de venas interconectadas, estando las más finas libres en el mesófilo; presentan un borde dentado y cuentan con lóbulos separados por senos; sin embargo, su apariencia se modifica de acuerdo con la variedad de que se trate en aspectos como el largo y ancho, tamaño, presencia de irregularidades en el borde, (puede ser trilobulada o pentalobulada), la forma del seno peciolar, pubescencias, y en la coloración, la cual varía desde el verde claro u oscuro hasta el rojizo (Chauvet y Reigner, 1984). El peciolo es cilíndrico y tiene un segmento aplanado o con una escotadura ligeramente extendida hacia el superior; las brácteas son hojas cortas, anchas, nacidas de la base agrandada del peciolo y caen temprano, al iniciar el periodo de crecimiento. La filotaxia presenta un arreglo dístico, es decir, dos hileras verticales. De acuerdo con Winkler, (1981) cuenta además con zarcillos, brotes estructuralmente hablando, discontinuos en su posición, esto es, los zarcillos opuestos a dos hojas adyacentes no tiene un zarcillo que se oponga a la tercer hoja; los zarcillos se forman del lado opuesto a la yema.

La flor individual es en realidad un brote lateral que lleva hojas modificadas especialmente para llevar a cabo la reproducción; es hermafrodita, pequeña, y consta de un cáliz con cinco sépalos rudimentarios, soldados; una corola con cinco pétalos anormalmente tres a nueve

de color verde, soldados en el ápice, caediza; cinco estambres y un pistilo en forma de botella casi siempre con dos carpelos, a veces tres, saliendo de cada uno, dos óvulos. La inflorescencia es un racimo, cuyo eje principal se llama raquis, de forma cónica, del cual, a intervalos regulares salen ramas para formar pedicelos que llevan las flores individuales; se encuentran dispuestos en los nudos de los sarmientos jóvenes, a razón de 1-4 por sarmiento, y por su posición, asemeja al zarcillo (Winkler, 1981).

El fruto es una baya de forma variable entre globosa, elíptica u ovoide, de color variable entre el verde, dorado, rosa o negro. El epicarpio, conocido por los vitivinicultores como hollejo, envuelve al fruto y está cubierto por un polvo ceroso, la pruina, que es de carácter hidrofóbico y retiene olores, constituyendo del 5 al 12% del peso total del fruto. El mesocarpio y endocarpio, constituyendo lo conocido como pulpa, la cual es generalmente incolora, a excepción de las variedades tintóreas, relleno casi en su totalidad al fruto, y se encuentra constituida por agua entre 70 y 85%, de 15 al 25% por carbohidratos, por ácidos de un 0.3 a 1.5%, y entre 0.03 a 0.17% por compuestos nitrogenados (Marro, 1989).

Las semillas, conocidas en la vitivinicultura como pepitas, (Marro, 1989 y Winkler, 1981), se presentan de una a dos por fruto y se encuentran unidas al pincel, por medio de un conjunto de vasos que alimentan al fruto. Constituyen el 10% del peso del fruto, y contienen entre 5 y 8% de taninos y de 10 a 20% de aceites.

### **3.1.1. *Sorghum bicolor* (L) Moench**

Según Ochse *et al.* (1982), el sorgo, es una planta anual, que constituye el principal cultivo de los trópicos semiáridos. Presenta raíces principales muy abundantes, reunidas en un fascículo; esta reforzado por un sistema de raíces adventicias, nacidas de los primeros tres nudos del tallo; Freeman (1975) refiere que las raíces nodales nacen de ocho verticilos en una planta, indicando que las del 6º, 7º y 8º se elevan por encima del suelo, creando raíces de sostén, durante las últimas etapas de crecimiento; de acuerdo con Guerrero (1992), logran una profundidad de dos metros.

Esta constituida por un solo tallo proveniente de la semilla, aunque algunas variedades tienen rizomas que producen tallos adventicios provistos de raíces propias en los dos primeros nudos, que pueden tener incluso una vida independiente de la planta madre. El tallo es cilíndrico, erecto, sólido, con una altura variable de 0.6 a 5 m, según la variedad, con un diámetro entre uno y cinco centímetros en la base. Metcalfe y Elkins (1987) menciona que suelen presentar acanaladuras en un lado entre los nudos; los entrenudos acanalados se alternan de un lado a otro y cuentan con una yema lateral en cada nudo, en posición opuesta.

La hoja o nomófilo esta compuesta por la lámina foliar, una vaina y una lígula. La vaina foliar, más larga que los entrenudos, se encuentra fija al nudo y rodea al tallo dando aproximadamente 1.33 vueltas alrededor de la base del entrenudo; en cada uno de los nudos, el borde de la vaina queda superpuesto y se encuentra alternadamente a la derecha o a la izquierda, siendo mas gruesa en la parte media pero se adelgaza hacia el borde externo,

donde se torna membranosa. El cuello de la vaina se forma en la unión de la vaina y el limbo; la parte interior del limbo esta delimitada en la base por la lígula, cuyos flancos están formados por dos zonas triangulares o curvadas, provistas en forma de tiras llamadas papadas, lóbulos o triángulos del cuello, que son de textura suave y a menudo rizado para dar movilidad a la hoja. La lígula es un crecimiento membranoso, delgado, ubicado entre la unión de la vaina y el limbo, de aproximadamente dos milímetros; rodea firmemente el entrenudo o la vaina de la siguiente hoja; antes de la madurez, es translúcida, luego se seca y decolora en algunas partes, soliendo desgarrarse (Freeman, 1975). El limbo es de forma lanceolada, glabras, con superficie cérea, de bordes aserrados; es rígido y erguido, se extiende en forma de abanico y cuando van creciendo, son curvadas suavemente; tiene una longitud comprendida entre 0.3 y 1 m, con un ancho variable de dos a siete centímetros; la coloración varía del verde oscuro al claro o amarillento, y puede presentar zonas o franjas descoloridas. La filotaxia es alterna, formando con el tallo un ángulo de  $180^\circ$  y se presentan en un número comprendido entre 5 y 28 hojas por tallo. Robles (1994) señala que las hojas del sorgo se doblan durante periodos de sequía, característica que al reducir la transpiración, contribuye a su peculiar resistencia a la sequía.

Las flores del sorgo son espiguillas que se presentan en pares: una es sésil, hermafrodita y fértil, y la otra pedicelada y estéril pero bien desarrollada, salvo por la espiguilla terminal que nace en una rama y va acompañada por dos espiguillas pediceladas. La espiguilla sésil posee dos flósculos: uno perfecto y fértil y el otro estéril (Poehlman y Allen, 2003). Las espiguillas pediceladas están formadas por dos glumas, una masculina, fértil que consta de dos glumillas, las dos glumelas y tres estambres; las espiguillas sésiles están formadas por dos glumas, una femenina fértil, que consta de dos glumillas, dos glumelas y dos carpelos

conformando un ovario unilocular provisto de dos estilos plumosos; la otra flor de la espiguilla ha quedado reducida a una glumela. La desarticulación debajo de la espiguilla sésil, la sección del raquis y el pedicelo o los pedicelos, caen adheridos de la espiguilla sésil (Lebgue y Valero, 1986; Gould y Shaw, 1992). Conforme a lo citado por Freeman (1975), la espiguilla fértil tiene una longitud promedio de 2.5 a 6.25 mm mientras que la espiguilla estéril llega a medir al doble.

Ibar (1984) establece que las flores están reunidas en espiguillas y éstas en espigas, a su vez las espigas forman una inflorescencia en panícula o panoja constituida por un eje principal con las correspondientes ramificaciones secundarias y terciarias en cuyos extremos están situadas las espiguillas. Las panojas tienen una longitud comprendida entre 0.20 y 0.40 m cuyo eje o pedúnculo central será, según su consistencia: erguido, doblado o arqueado. Asimismo, la forma de la panícula es variable, pudiendo ser ovoide, cilíndrica, redondeada, elipsoide, obovoide o conoide. Hughes *et al.* (1976) mencionan que una panícula puede llegar a tener hasta 6,000 espiguillas fértiles.

González (1987) describe al fruto o grano como una cariósida gruesa, comprimida, de forma redondeada u oval, con un diámetro promedio de tres a seis milímetros; alcanza diferentes tonalidades y presenta coloraciones a partir de colores básicos como el blanco, amarillo, rojo, azul, café, negro o gris. El endospermo ocupa entre el 80 y 85% del grano, pudiendo ser de tipo blando y farináceo, o duro y muy córneo, o bien, ceroso o azucarado; el embrión representa entre el 8 y 12%; y del 7 al 9% restante lo completa el pericarpio, donde pueden existir pigmentos, en la testa o en ambos, pero no en el endospermo, el cual es de color blanco (Martín, 1975). Hay, según Hughes *et al.* (1976) y Robles (1994), de

25,000 a 66,000 semillas de sorgo por kilogramo, aunque Metcalfe y Elkins (1987) reportan hasta 133,000 semillas por kilogramo. Martín (1975), establece rangos para el tamaño de la semilla, siendo pequeñas cuando pesan entre ocho y diez miligramos, medianas de 12 a 24 mg y grandes de 25 a 35 mg.

### **3.1.1. *Agave tequilana* Weber cv. Azul**

El agave azul, tequilero o bermejo es una planta perenne, rizomatosa, suculenta de dimensiones cercanas a 1.5 m de alto y 1.5 m de diámetro, llegándose a extender radialmente de 2.2 a 2.8 m (Claridades Agropecuarias, 2000).

Presenta un sistema sistema de raíces fasciculado. Respecto al tallo, Blomberg (2000) señala que la planta tiene un tronco grueso, el cual da la apariencia de una piña grande, es muy corto o prácticamente inexistente, con una altura entre 30 y 50 cm al madurar, por lo cual el agave es considerado acaulescente, pero de él nacen de 30 a 40 hojas (Motts (1932).

Según Martínez (1994), las hojas se encuentran dispuestas en roseta, presentando una coloración glauca azulada, azulado, azul verdoso o verde grisáceo; tienen una longitud aproximada de 0.90 a 1.20 m y de 8 a 12 cm de ancho; su consistencia es carnosa o suculenta; son lanceoladas, tienen la apariencia de espadas de doble filo, de ápice acuminado; posee fibras firmes, casi siempre rígidamente estiradas, cóncavas de ascendentes a horizontales; lo más ancho de las hojas se encuentra hacia la mitad y son angostas y gruesas hacia la base; son sésiles, delgadas y rectas. El margen de la hoja varía

de recto a ondulado; todo el borde presenta dientes marginales vueltos hacia el ápice, con dientes de color café claro a rojizos, triangulares, delgados, curvos o flexos desde poca altura de la base piramidal, de tres a cuatro centímetros de longitud y separados a una distancia de 1.0 a 41.5 cm, presentando el margen ligeramente blanquecino (Gentry, 1982). Tiene una púa terminal de color rojo o café oscuro, de uno a dos centímetros de longitud; raramente es muy larga, achatada o abiertamente surcada de arriba; su base es ancha. La superficie verde o fotosintética de una planta de agave es de 75.9 m<sup>2</sup> (Gobierno del Estado de Hidalgo, 1988).

Las flores, de acuerdo a Valenzuela (1997), miden entre 68 y 75 mm de longitud, con bracteólas de tres a ocho milímetros de longitud sobre los pedicelos; son protándricas y presentan periantio amarillo infundibuliforme, los tépalos son desiguales, de 25 a 28 mm de largo por cuatro milímetros de ancho, lineares, erectos pero rápidamente flojos en la anthesis, cambiando entonces a cafés y secos; presentan un tubo polínico cuya longitud es de aproximadamente diez milímetros de ancho, funeliforme y surcado, dividido en seis segmentos regulares; tienen seis estambres rosados filamentosos, más largos que los segmentos del perigonio, de 45 a 50 mm de largo, doblados hacia adentro junto con el pistilo, insertos de siete a cinco milímetros cerca de la base del tubo; las anteras son amarillas, de 25 mm de longitud; presenta ovario ínfero tricarpelar, de 32 a 38 mm de largo, cilíndrico, con cuello corto, inconstricto (no contraído), casi terminado en punta sobre la base con placentaciones axilares, multilobulada. Las flores varían desde un color verde hasta un color blanco amarillento.

Florece formando un largo escapo floral agrupándose en una inflorescencia de tipo panícula piramidal, la cual tiene una altura entre cinco y seis metros; es densamente ramosa a lo largo, con aproximadamente 25 umbelas largas y difusas de flores; tras su floración, muere la planta, dejando a su alrededor una colonia de retoños (Granados, 1993). De acuerdo con Loyola (1956), el tiempo requerido para florecer se encuentra en función de factores como la variedad, las condiciones del terreno, el clima y el manejo agronómico dado al cultivo, pero señala que en condiciones cultivadas se produce entre 8 y 12 años mientras que en las especies silvestres el proceso suele ser más prolongado.

El fruto es una cápsula leñosa, de forma triangular, delgada, dehiscente con numerosas semillas aplanadas, algo triangulares, de testa negra, monocárpicas, con el embrión recto y endospermo carnoso (Granados, 1993).

### ***3.2. Características anatómicas de las hojas***

Las hojas o nomófilos constituyen la parte fundamental de las plantas, debido esencialmente por la absorción de la luz para realizar la fotosíntesis, proceso elemental para obtener la energía requerida para efectuar los diversos procesos biológicos; además son las responsables de efectuar el intercambio gaseoso ( $O_2$  y  $CO_2$ ); de prevenir las pérdidas de agua por transpiración; se encargan de la absorción de agua y nutrientes; pueden almacenar y traslocar los fotoasimilados; e incluso sirven en algunos casos como medios de protección (hipsófilos) o trampas (Dickinson, 2000).

De acuerdo con lo establecido por Fuentes (1998), morfológicamente las hojas se encuentran formadas por: un peciolo, gracias al cual se insertan al tallo; el limbo o lámina foliar, el cual constituye la superficie plana de la hoja; la vaina, consistente en un ensanchamiento del peciolo y por donde circulan los haces vasculares; y las estípulas, apéndices basales ubicadas entre el tallo y el peciolo, aunque como lo señala Strasburger (1991), no todas las plantas las poseen o son poco longevas. Sin embargo, suele suceder en muchas hojas pueden faltar una o dos de esas partes, o bien pueden encontrarse sumamente modificadas, al grado de ser irreconocible, en cuyo caso se habla de hojas incompletas. Dichas variaciones responden a un modelo de adaptación evolutiva de las plantas en relación con su hábitat, o bien, a la etapa de desarrollo presente.

Anatómicamente, las hojas se encuentran constituidas por tres tipos de tejidos: el dérmico, el fundamental y el vascular, además presentan un desarrollo apical definido; dicho de otra manera, una lámina foliar esta formada por la epidermis superior e inferior, donde se encierra el mesófilo clorofílico el cual es atravesado por un sistema vascular (Esau, 1985).

Adicionalmente se establece que la variabilidad en la estructura del mesófilo se encuentra altamente correlacionada con el hábitat de desarrollo, natural o artificial, así como a su etapa de desarrollo y sus características genéticas (Dickinson, 2000).

### **3.1.1. Tejido epidérmico**

La epidermis se compone de un solo estrato celular enlazado entre sí, carente de cloroplastos; cubriendo las áreas adaxial y abaxial (Wilson y Lomis, 1980). Se encuentra

constituido por diferentes tipos de células, como las guardianas u oclusivas de los estomas, las subsidiarias, tricomas glandulares y no glandulares, silíceas y buliformes entre otras, aún cuando Dickinson (2000) la limita a un conjunto de células planas y unidas de forma continua.

En la mayoría de las hojas de las monocotiledóneas (liliópsidas), se presentan células buliformes (forma de burbuja), distribuidas sobre la superficie y arregladas en bandas longitudinales. Éstas son relativamente grandes, con paredes delgadas, además de presentar grandes vacuolas y poco contenido sólido. En algunas especies, los cambios en la turgencia de las células buliformes gobiernan el enrollamiento longitudinal y el desenrollamiento de la hoja bajo distintas condiciones de humedad, pero en otras aparentemente carece de función (Cronquist, 2000).

La epidermis tiene principalmente una función protectora, regula la evaporación de agua del tejido interno; provee una barrera parcial de infecciones y lesiones mecánicas; contribuye a la distribución uniforme de agua y solutos y puede tener paredes gruesas, las cuales tanto firmeza como rigidez (Wilson y Lomis, 1980). Para lograrlo, se encuentra cubierta por una capa de cera definida, siendo más gruesa en el haz que en el envés, además de contar con la presencia de tricomas. El rasgo más característico de la epidermis es la presencia de cutina en sus membranas, especialmente la externa; y de capas de cutícula, desarrolladas sobre su superficie. Su grosor se relaciona con las condiciones ambientales de desarrollo, manifestando en condiciones con baja humedad relativa un amplio grosor, contrastando incluso hasta su inexistencia cuando la humedad presente en el ambiente es muy elevada (Ruíz Oronoz, 1979).

Al respecto, Bálsamo *et al.* (2003) encontraron en un estudio donde se comparó dos plantas rosáceas, una de tipo caducifolio (*Prunus serrulata*) y otra perenne (*Heteromeles arbutifolia*), diferencias anatómicas de un 90% el grosor de la cutícula, como resultado de su ambiente de desarrollo. De manera similar, Shawkym *et al.* (1997) indicaron que en vid bajo condiciones de estrés hídrico se incrementó el grosor de su cutícula, el área celular de la epidermis y los espacios intercelulares en la anatomía de las hojas.

En su estructura histológica se pueden apreciar espacios intercelulares, conocidos como estomas, que son células en forma de cono con un espacio entre sí, rodeados de células especializadas en regular el tamaño y tiempo de la abertura, formando un poro por el cual se produce la salida del vapor de agua y el intercambio gaseoso entre la planta y la atmósfera, de acuerdo a las condiciones ambientales dominantes en un momento dado (Rodríguez 1982). Dichas estructuras son las encargadas de la regulación de la transpiración.

El número de estomas presentes en la epidermis inferior de una hoja depende de la especie, presentándose por lo general entre 15 y 1,000 por  $\text{mm}^2$ ; en algunos casos son solamente 10 por  $\text{mm}^2$ , pero pueden llegar a ser hasta 1,300 por  $\text{mm}^2$ ; tienen un tamaño entre 3 y 12  $\mu$  de ancho y de 7 a 40  $\mu$  de longitud, constituyendo del 0.5-2% de la superficie de la superficie inferior de la hoja (Cronquist, 2000).

### **3.1.2. Tejido fundamental**

El mesófilo es el tejido medio comprendido entre la epidermis adaxial y abaxial, con excepción de los haces vasculares, conductos laticíferos, resiníferos o lisígenos; su función fundamental es efectuar el proceso fotosintético, gracias a los espacios intercelulares existentes y conectados con la atmósfera exterior a través de los estomas, facilitando el intercambio de gases (Stern, 1994; Santamarina et al, 1997).

Este tejido se encuentra constituido principalmente por clorénquima (parénquima con clorofila), dividido como parénquima en empalizada en la parte superior de la hoja y parénquima esponjoso en la parte inferior de la hoja. Las proporciones y arreglo de los tejidos en empalizada y esponjoso varían de acuerdo con la especie y el ambiente: en el caso de hojas bifaciales se presentan ambos tipos; en las unifaciales suele existir parénquima en empalizada en ambas superficies y en el caso de hojas equifaciales, el parénquima en empalizada se encuentra alrededor de la circunferencia de la hoja (Ramos y Zavaleta, 1993).

El mesófilo está adaptado estructuralmente para que en él se efectúe la fotosíntesis, ubicándose el tejido más denso y con mayor concentración de cloroplastos hacia la parte superior, donde se recibe una mayor cantidad de luz. El espacio intercelular es mayor cerca de los estomas, los cuales constituyen la puerta de entrada del CO<sub>2</sub> del exterior, disminuyendo este espacio progresivamente hacia la superficie superior, y distribuyendo en éste el CO<sub>2</sub>. La evaporación en las células del parénquima en empalizada esta controlada por la superficie de las paredes que están en contacto con espacios intercelulares.

### 3.1.2.1. Parénquima en empalizada

El parénquima en empalizada consta de una o dos filas de células alargadas de formas columnares, cilíndricas o prismáticas localizadas justamente debajo de la epidermis superior y perpendicular a ella. Sus células están bastante unidas, pero por lo general la mayor parte de la pared colinda con espacios intercelulares más que con otras células y a menudo se angostan hacia la base (Esau, 1985; Cronquist, 2000).

La presencia de cloroplastos resulta mucho más abundante en comparación con el parénquima esponjoso, ocurriendo en consecuencia la mayor parte de la fotosíntesis producida en la hoja (Santamarina et al, 1997). Además, Ramos y Zavaleta (1993) mencionan que generalmente el parénquima en empalizada está dispuesto en la cara foliar que recibe la mayor incidencia luminosa, sin considerar que en las plantas de alta capacidad fotosintética, como las plantas C-4, este tejido se ubica en ambas caras de la hoja. (Cuadro 1) Sin embargo, la disposición de los cloroplastos depende de la intensidad de la luz: si hay mucha luz, se adosan a la superficie celular iluminada, y si la luz es débil, se apartan de ella (Paniagua et al. 1996).

**Cuadro 1. Relación de cloroplastos entre parénquima en empalizada y esponjoso.**

ESPECIE	CANTIDAD DE CLOROPLASTOS EN PARÉNQUIMA			
	EN EMPALIZADA		ESPONJOSO	
	CANTIDAD	%	CANTIDAD	%
<i>Fragaria eliator</i>	86	84	14	16
<i>Ricinus comunis</i>	82	78	18	22
<i>Brassica rapa</i>	80	75	20	25
<i>Helianthus annus</i>	73	63	27	37
<i>Phaseolus multiflorus</i>	69	55	31	45

FUENTE: Adaptado de Esau, 1985, con base en Schürhoff, 1924.

### 3.1.2.2. Parénquima esponjoso

El parénquima esponjoso o lagunar, consta de células muy variadas, isodiamétricas o alargadas en la misma dirección que las células en empalizada, pero típicamente irregulares con grandes espacios intercelulares, teniendo brazos o salientes extendidos hacia fuera conjuntándose con otras células. Consta de más de una capa de células de espesor que se disponen en hileras no definidas y tiene pocos cloroplastos (Ramos y Zavaleta, 1993; Cronquist, 2000).

Por lo general, éste tipo de tejido está asociado con los estomas por rodear las cámaras estomáticas; de igual manera la presencia de espacios intercelulares facilita el intercambio gaseoso. Se puede decir que mediante estos espacios, la hoja está en contacto con el medio aéreo, especializándose en el intercambio de gases que, a través de las cámaras subestomáticas y los estomas, alcanzan el exterior, aumentando con ello la eficacia de la fotosíntesis, por lo cual se le denomina superficie interna, de gran importancia ecológica (Paniagua *et al.* 1996) .

Según Esau (1985), la magnitud del sistema de aireación interna puede ilustrarse mejor mediante números. La proporción del aire por volumen de hojas normales varía entre 77 partes por 1000 en *Camphora officinalis* y de 713 partes por 1000 en *Pistia texensis*. El origen de los espacios intercelulares es esquizogénico normalmente, aunque en algunas plantas pueden ser lisígenos.

### 3.1.3. Tejido vascular

Los sistemas vasculares están constituidos por las venas de las hojas, las cuales constan de un cordón de xilema y floema, rodeados colectivamente por una cubierta del haz vascular, cuyos cordones de tejido especializado cumplen con la doble función de sostén y conducción. Se encuentran situados a una media distancia entre la epidermis superior e inferior (Wilson y Loomis, 1980).

Una hoja puede tener desde una sola vena, siendo las hojas plurinervias comunes entre los helechos superiores y las angiospermas, cuyos tipos generales de venación son el reticulado y el paralelo (Esau, 1985). En la venación reticulada, frecuentemente en las *Magnoliópsidas* o dicotiledóneas, los haces vasculares de distintos tamaños forman por anastomosis una red, con los haces más pequeños que divergen de los más grandes. En las hojas paralelinervias, características de las *Liliópsidas* o monocotiledóneas, se disponen paralelamente haces del mismo tamaño relativamente uniformes, pero convergen entre sí en el ápice o en ambos extremos del limbo foliar y en sus bordes

Una vena típicamente consta de un cordón de xilema y uno de floema, rodeados colectivamente por una cubierta del haz vascular. El floema se localiza en la parte inferior (abaxial) y el xilema en el lado superior (adaxial) (Cronquist, 2000). La mayoría de las venas constan solamente de tejidos primarios, pero muestran también crecimiento secundario en las venas grandes de muchas dicotiledóneas. El número de elementos de xilema y floema que forman la vena disminuyen progresivamente con el tamaño de la

misma. Las venas más pequeñas a menudo tienen una sola traqueida, con el floema representado por una sola célula parenquimatoso modificada.

La nervadura media y algunas laterales se encuentran impregnadas de una masa de parénquima compacto en lugar de estar rodeados por una cubierta del haz vascular; asociado al parénquima existe tejido de sostén, generalmente colénquima y a veces esclerénquima (éstos tejidos sobresalen en la superficie inferior de la hoja y marcan la posición de las venas). El resto de las venas se encuentran en la parte superior del mesófilo esponjoso bajo la capa de parénquima en empalizada.

Ontogénicamente, la cubierta del haz vascular es parte del mesófilo, pero se trata de un tejido formado por una sola capa de células vivas, alargadas y de paredes delgadas rodeando por completo a la vena y cubriendo los extremos. El eje más largo de las células es paralelo al de la vena y no existen espacios intercelulares evidentes (Cronquist, 2000).

La venación de los catáfilos, hipsófilos y cotiledones es parecida a la de los nomófilos de la misma planta pero más simple; se presenta como si estuvieran ontogenéticamente subdesarrollados (Esau, 1985).

La característica especialmente importante del sistema vascular de la hoja, cualquiera que sea su estructura detallada, es la estrecha relación espacial entre los tejidos vasculares y el mesófilo. Las mediciones llevadas a cabo sobre seis especies de magnoliópsidas, herbáceas, arbustivas y arborescentes, han demostrado que la longitud total de las venas es en promedio de  $1.2 \text{ m} \cdot \text{cm}^{-2}$  de limbo foliar (Esau, 1985).

### ***3.3. Características anatómicas de las hojas de plantas C-3***

El ciclo fotosintético más común, la vía C-3 o de Calvin – Benson, se caracteriza porque el primer producto de la fotosíntesis es el compuesto de tres carbonos (ácido 3-fosfoglicérico). Anatómicamente, la estructura de la vaina parenquimática del haz tiene pocos orgánulos y cloroplastos pequeños, de forma tal que las células parecen vacías y claras en contraste llamativo con el mesófilo en cloroplastos (Esau, 1982; Stern, 1994).

Por su parte, Ramos y Zavaleta, (1993) indican que esta condición se relaciona con la presencia de parénquima en empalizada hacia el haz y hacia el otro lado parénquima esponjoso, siendo en el primero en donde se presenta la mayor concentración de cloroplastos. Santamarina et al (1997) establecen que en las hojas de las gramíneas C-3, las células del mesófilo y las de la vaina vascular no están dispuestas concéntricamente; conjuntamente, también existe una vaina interna más o menos gruesa denominada vaina del mesotoma.

Además en las gramíneas C-3 se presentan más de cuatro células de mesófilo entre vainas adyacentes, siendo en promedio de doce. Esta distancia entre las vainas de los nervios conductores está estrechamente relacionada con la baja velocidad de incorporación de los productos de la fotosíntesis al interior de los tubos cribosos, pues la distancia comparada con las C-4 es mayor (Flores-Vindas, 1999).

Esta vía metabólica se encuentra presente en la mayoría de las especies vegetales, generalmente en todos los grandes árboles y los arbustos, las plantas cultivadas y las

hierbas de las zonas templadas, incluyendo todas las especies de *Gimnospermae*, las briofitas y las algas.

### ***3.4. Características anatómicas de las hojas de plantas C-4***

Después del descubrimiento de la vía C-4 de la fotosíntesis en la caña de azúcar, se realizaron estudios dedicados a la anatomía comparativa de las hojas de las gramíneas en relación con las vías de la fotosíntesis, descubriendo que las hojas de esta familia botánica presentan diferencias anatómicas bastantes claras (Santamarina, 1997).

En el caso de las plantas C-4 ocurre una situación especial, pues la fotosíntesis se encuentra adaptada a las condiciones predominantes de regiones áridas con una fuerte irradiación solar, extendiéndose a regiones tropicales. En estas plantas, la fijación definitiva de CO<sub>2</sub> tiene lugar en las células de las vainas hísticas las cuales, en consecuencia, son particularmente grandes y ricas en plastidios (el tipo corona de los haces conductores) (Strasburger, 1991).

Anatómicamente, en las plantas C-4 la vaina parenquimática del haz tiene un alto contenido de orgánulos, especialmente mitocondrias y microsomas y sus cloroplastos son verde intenso, con mayor contenido de almidón y a menudo más grandes que los cloroplastos del mesófilo, los cuales pueden estar ubicados próximos a la pared tangencial externa o en el lado opuesto de la célula y las paredes de la vaina están engrosadas (Esau, 1982).

Poseen una disposición ordenada de las células del mesófilo con respecto a la vaina, formando las dos juntas capas concéntricas alrededor del haz vascular, es decir, no hay diferenciación alguna en el parénquima, pero cada paquete vascular tiene una mayor concentración de clorofila .alrededor de las células de la vaina; Mauseth (2003), señala que en las células del mesófilo se encuentra la enzima PEP-carboxilasa (fosfoenolpiruvato), la cual tiene una elevada afinidad con el CO<sub>2</sub>. En términos generales, Esau (1982) determina que la asociación espacial entre el mesófilo y los haces vasculares parece más cercana en las plantas C-4 que en las C-3.

Las células de las vainas fasciculares y las del mesófilo están en conexión entre sí a través de numerosos plasmodesmos. Todo el complejo hístico actúa, en última instancia, como una bomba de CO<sub>2</sub>, los plastidios de las vainas hísticas están también óptimamente abastecidos de CO<sub>2</sub> cuando la concentración de CO<sub>2</sub> en el aire intercelular es muy baja, de manera que, incluso en los estomas estrechados (para reducir la transpiración) puede seguir difundándose bastante CO<sub>2</sub> a partir del aire exterior (Strasburger, 1991).

Por el arreglo, tanto de las células de la vaina como las de mesófilo, en forma concéntrica alrededor de los haces vasculares, en su conjunto también reciben el nombre de mesófilo radial, en tanto que por su apariencia histológica, dando la apariencia de un engrosamiento alrededor de los haces vasculares, ambos reciben el nombre de mesófilo de la corona y finalmente la llaman estructura Kranz, dedicada al investigador quien describió ambos tipos del xerófito por primera vez (Ramos y Zavaleta, 1993).

De acuerdo con Salisbury y Ross (1994), las especies vegetales C-4 sólo representan el 0.4% del reino vegetal, siendo en su gran mayoría plantas monocotiledóneas, aunque más

de 300 son dicotiledóneas, sabiéndose también que éste ciclo metabólico se presenta en alrededor de 1,000 especies de angiospermas. Las plantas C-4 están representadas en cerca de 19 familias botánicas, entre ellas *Aizoaceae* (plantas de regiones frías), *Amaranthaceae*, *Asteraceae*, *Chenopodiaceae*, *Cyperaceae*, *Euphorbiaceae*, *Poaceae* -cerca de la mitad de las especies de gramíneas, destacando por su importancia agronómica la caña de azúcar, el maíz, el sorgo y numerosos pastos forrajeros-, *Nyctaginaceae*, *Portulacaceae* y *Zygophyllaceae* (Esau, 1982).

### ***3.5. Características anatómicas de las hojas de plantas MAC***

Las plantas correspondientes al metabolismo ácido crasuláceo (MAC) o CAM por sus siglas en inglés, son características de plantas xerófitas, típicas de las zonas áridas y semiáridas del orbe. Para su supervivencia en condiciones de elevadas temperaturas y escasa humedad relativa, deben reducir al máximo la transpiración, para lo cual cuentan con adaptaciones y modificaciones a la sequía (Paniagua *et al.* 1996).

Son plantas provistas de tejido para almacenar agua (suculentas) y en particular, aquellas que poseen cloroplastos y grandes vacuolas en la misma célula, forman y almacenan ácidos orgánicos (sobre todo malato) durante la noche. En la mayoría de las plantas MAC, los procesos se corresponden en gran parte con los de las plantas C-4, sólo que la fijación previa del CO<sub>2</sub> por la PEP-carboxilasa y la fijación definitiva de CO<sub>2</sub> no están separadas en el espacio (mesófilo / vaina de los haces vasculares) sino en el tiempo (Strasburger, 1991).

El efecto de las condiciones ambientales en la morfología y anatomía de la hoja ha producido una gran variedad de adaptaciones, dependiendo del taxa del vegetal en cuestión. Dickinson (2000) menciona algunos aspectos generales como la reducción en el tamaño de las hojas, incremento en el grosor de las células epidérmicas, de la cutícula y en la densidad de tricomas, así como la reducción del área estomatal. Otras características significativas son la lignificación, el incremento en la succulencia y la acumulación de mucílago, lo cual puede contribuir en la resistencia a la deshidratación y el estrés hídrico.

Las características histológicas más singulares de este tipo de plantas son la presencia de células epidérmicas muy engrosadas, a veces lignificadas, y de cutícula gruesa (Paniagua *et al.* 1996). Se reporta que en algunas plantas la epidermis suele ser poliestratificada, la cual es una estrategia vegetal para evitar la pérdida de agua por desecación. Otra característica importante es la presencia de abundantes tricomas, los cuales le sirven de protección a la luz excesiva y de la pérdida de agua.

Según lo referido por Stern (1994), los estomas suele ser abundantes, pero se encuentran protegidos en criptas y cerrados durante la época estival. Además, poseen abundante parénquima en empalizada que puede formar varias capas y se encuentra en ambas caras. Gracias a esta característica, se facilita el rápido intercambio hídrico entre el sistema vascular y el exterior, pues por los espacios del parénquima lagunar no circula bien el agua, la cual requiere de pequeños canales.

El parénquima esponjoso es escaso o ausente, en su lugar, hay parénquima acuífero, que es un tejido almacenador de agua, con células capaces de hincharse y recobrar su forma cuando el agua disminuye. De acuerdo con Paniagua *et al.* (1996) cuando llueve, las hojas

retienen gran cantidad de agua para reservarla; para ello necesitan disponer de un xilema abundante y bien desarrollado de conducción por medio de traqueidas y de epidermis muy gruesa, presentan en sus hojas una epidermis múltiple tanto en el haz como en el envés, cubiertas de una capa gruesa de cutícula, con estomas hundidos y la presencia de tricomas.

El metabolismo ácido crasuláceo, MAC, es característico de algunas familias botánicas, como *Agavaceae*, *Asclepiadaceae*, *Asteraceae*, *Bromeliaceae*, *Cactaceae*, *Crasulaceae*, *Cucurbitaceae*, *Didereaceae*, *Euporbiaceae*, *Geraniaceae*, *Lamiaceae*, *Liliaceae*, *Orchidaceae*, *Oxalidaceae*, *Pipereaceae*, *Polypodiaceae*, *Portulacaceae*, e incluso de algunas gimnospermas (*Welwitschiaceae*), coníferas y helechos tropicales (Mauseth, 2003).

### ***3.6. Características anatómicas de las plantas desarrolladas in vitro***

Las investigaciones en anatomía de plantas propagadas *in vitro*, han mostrado que las hojas presentan poco desarrollo del parénquima en empalizada y presentan una cantidad significativa de espacios intercelulares en el mesófilo, y que el desarrollo de la cutícula es considerablemente menor comparada con las plantas crecidas en ambientes externos. En cuanto a la supervivencia de las plantas en este ambiente estuvo influenciada en los nuevos tejidos por una mejor conexión del tejido vascular, entre otros factores (Sutter and Langhans, 1979; Read y Fellman, 1985, Debergh, 1991; Preece y Sutter, 1991; Vázquez, 1994).

Las variaciones de las condiciones ambientales durante el cultivo *in vitro*, pueden alterar las características anatómicas de las plantas. Capellades *et al.* (1990) encontraron en *Rosa multiflora* que el número de estomas y la longitud de las células epidérmicas de la parte adaxial de las hojas fueron mayores cuando se establecieron *in vitro* con 75% de humedad relativa y una intensidad de luz de  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , en comparación con plantas sometidas a 100% de humedad relativa y  $25 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Además demostraron la existencia de hidatodos en las plantas con mayor humedad.

Huguet *et al.* (1993) menciona que en plantas de *Rosa* spp, los estomas no fueron funcionales durante la fase *in vitro* y este resultado fue similar en la fase de aclimatación cuando se sometieron a siete horas de luz ( $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y/o solamente siete horas de oscuridad. El área total de la vacuola, con respecto a las células guarda fue 40% mayor en la luz que en la oscuridad, donde decreció un 20% en hojas aclimatadas. *In vitro*, las vacuolas siempre presentaron un tamaño del 40% con respecto a las células guarda, indicando que la luz no promovió la apertura o cierre estomático, sino que fue necesario un cambio en el gradiente de potencial de agua. Con una reducción en la humedad relativa del medio de cultivo o con una elevación de iones calcio fue posible inducir *in vitro* la funcionalidad de las células guarda. Los estomas de hoja *in vitro* no fueron funcionales o lo fueron muy poco y no pudieron ser reparados, a pesar de haber establecido las plantas en condiciones normales.

Fabbri (1986) encontró que las hojas de fresa formadas *in vitro* fueron relativamente más delgadas, caracterizadas por una baja formación de células en empalizada, normalmente se tienen de tres a cuatro estratos de tejido en empalizada, presentaron en el mesófilo amplios

espacios intercelulares, ello debido a que el número de células no varió, sino su tamaño, el cual estuvo en relación con el grosor de las hojas. La cera epicuticular en la superficie abaxial y adaxial se incrementó en las hojas los primeros 20 días después de transferirse, sin embargo en hojas recién formadas fue más densa y compleja, y en algunos casos cubrió los estomas. Las hojas salidas del tubo se encontraron en un estado de diferenciación intermedio y si persistieron durante la aclimatación no llegaron a tener todas las características de una hoja normal, por lo cual el vigor de la planta, dependió de la formación de hojas nuevas.

En otro estudio realizado por Borkowska (2001) en tres variedades comerciales de *Fragaria x ananassa* Duch., logró demostrar que la capacidad fotosintética de las plántulas micropropagadas es limitada, pero sí favorece el desarrollo de nuevas hojas, al servir como fuente de aprovisionamiento de carbohidratos; además señala que conforme se desarrollan las nuevas hojas en condiciones normales, se incrementa la actividad fotosintética de las mismas.

Massai *et al.* (1997) en un estudio anatómico en kiwi, concluyeron que las plantas provenientes de condiciones normales tiene un mayor porcentaje de vasos y área foliar, mientras que las provenientes del cultivo *in vitro* reducen ésta área. Sin embargo, también determinaron que las diferencias morfológicas en éstas son estadísticamente no significativas, tal como se aprecia en el cuadro 2.

**Cuadro 2. Características de hoja de un año de edad en frutos de kiwi mediante el empleo de dos diferentes métodos de propagación.**

CARACTERÍSTICAS	MÉTODOS DE PROPAGACIÓN	
	MICROPROPAGACIÓN	COND. NORMALES
Área (cm <sup>2</sup> )	140.20	137.16 n...s.
Longitud (cm)	11.22 b	10.18 a
Ancho (cm)	12.10	12.31 n...s.
Diámetro de radio	0.99 b	0.86 a

Fuente: Massai *et al.* (1997)

NOTA. En cada línea, letras diferentes corresponden a diferencias estadísticas validadas por prueba de Duncan  $p=0.05$ .

Sutter y Langhans (1979) determinaron que la formación de ceras epicuticulares fue importante para el grado de supervivencia de plantas de clavel propagadas *in vitro*. La formación de cera fue mínima y amorfa cuando se comparó con la de crecimiento normal, pero presentaron un crecimiento del 70% durante las dos y media semanas de la fase de aclimatación, reflejando mayor supervivencia de las plántulas. Ellos determinaron que la calidad y cantidad de ceras epicuticulares fueron necesarias para impedir la pérdida de agua de las plantas *in vitro*, pero que no son el único factor que contribuyó al grado de supervivencia, asimismo, mencionan que la elevada humedad relativa, la alta temperatura y la baja intensidad de luz presentadas durante el desarrollo *in vitro*, participaron en la baja formación de ceras en la cutícula. En condiciones naturales, Freeman *et al.* (1979) encontraron en hojas de arándano que en la cutícula la cantidad de cera no se mantuvo constante a pesar de haber presentado madurez en la hoja. Los primeros 40 días se manifestó constante ( $75$  a  $83 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) después incrementó hasta los 70 días ( $136 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) y comenzó a decrecer hasta ubicarse en  $70 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  en las siguientes tres a cuatro semanas.

Sutter (1985) encontró diferencias en el contenido de ceras epicuticulares entre plantas cultivadas *in vitro* y producidas en invernadero, las cuales difirieron según la especie. (Cuadro 3). En *Spathiphyllum* spp se presentó mayor cantidad de ceras *in vitro* que en invernadero, por lo cual consideró que su formación estuvo asociada a condiciones fisiológicas y no solo a las ambientales. Además determinó que la conductividad estomática y la función fotosintética fueron más importantes en el proceso de aclimatación y no únicamente la cantidad de ceras producidas por cada especie.

**Cuadro 3. Cantidad de cera epicuticular ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) en plantas ornamentales producidas *in vitro*, en invernadero y durante la fase de aclimatación.**

ESPECIE	AMBIENTE		
	INVERNADERO	ACLIMATADAS	<i>IN VITRO</i>
<i>Dianthus</i> spp.	61.4	37.4	13.7
<i>Chrysantemum morifolium</i>	72.9	110.6	48.8
<i>Spathiphyllum wallissi</i>	2.9	4.0	4.3
<i>Maranta leuconeura</i>	5.8	5.5	4.8

Fuente: Sutter (1985).

La estructura de la cutícula se ve afectada en su estructura cuando existen cambios por la naturaleza físico – química de compuestos químicos, los cuales por su polaridad, carga y solubilidad pueden penetrar las cutículas (Bukovac, 1997), aunque Papparozzi y Tukey (1979) encontraron que el grosor de cutícula en seis especies de plantas ornamentales (Cuadro 4) no se modificó por la fertilización foliar.

**Cuadro 4. Grosor de cutícula ( $\mu\text{m}$ ) en hojas de diferentes especies teñidas con Sudán IV.**

ESPECIE	ESPESOR DE CUTÍCULA ( $\mu\text{m}$ )	
	ABAXIAL	ADAXIAL
<i>Pilea cadierei</i>	<2	<2
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	<2	<2
<i>Pachysandra terminalis</i>	3-4	3-4
<i>Ligustrum x Vicary</i>	3-4	1-3
<i>Juniperus chinensis</i>	3-5	--
<i>Hedera helix</i>	4-6	4-6
<i>Lilium longiflorum</i> <sup>a</sup>	1.55	1.05

<sup>a</sup> Guerrero, 2000.

Fuente: Paparozzi y Tukey, 1979.

La modificación de otras condiciones ambientales también puede generar modificaciones en la anatomía de las hojas *in vitro*, como lo encontraron Kirdmance *et al.* (1995) en un estudio realizado en *Eucalyptus camandulensis*, en el cual descubrieron que se incrementaba el espesor de las células del parénquima en empalizada, la densidad estomática y por tanto el índice fotosintético *in vivo*, cuando se enriquecía el ambiente con  $\text{CO}_2$ .

El agua contenida en el sustrato puede modificar las características anatómicas de las plantas. Shawky *et al.* (1997) encontraron en hojas de vid que al presentarse un estrés de agua (80% de deficiencia) el grosor de la cutícula aumentó en 47% con relación a un déficit de agua de sólo 20%, pero el grosor de las células epidérmicas, del parénquima en empalizada, del tejido esponjoso y la pared de los haces vasculares se incrementaron por arriba del 90%.

El medio nutritivo durante la fase *in vitro* también puede generar cambios anatómicos como los encontrados por Coorza *et al.* (1997) en las hojas de *Olea europea*, donde con el medio

MS se presentaron mejores características en las células en empalizada y en el tejido vascular comparado con otros medios de cultivo. Estos resultados son similares a los encontrados por Misuguchi *et al.* (1998) quienes al regenerar escamas de *Lilium japonicum*, agregando al medio ácido naftalen acético (ANA) más ácido butírico (BA) encontraron que la formación del sistema vascular, en forma regular, fue mayor en las escamas producidas en un medio sin reguladores y la formación fue irregular cuando se tuvo una alta concentración de BA.

Dimasi y Bosabalids (1997) encontraron que incrementando las concentraciones de magnesio y carbohidratos del medio de cultivo y aumentando la intensidad lumínica ( $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) se incrementó el grosor de la cutícula y el número de cloroplastos en *Actinidia deliciosa*, aunque a una menor intensidad ( $45 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) se incrementó la formación de almidón provocando deformación en las células del parénquima en empalizada.

En cambio, Mogollón *et al.* (2003) estudiaron en *Dieffenbachia maculata*, el contenido de clorofila a ( $\infty$ ) entre plantas obtenidas *in vitro*, aclimatadas y desarrolladas bajo condiciones naturales, encontrando una gran similitud en el comportamiento entre estas dos últimas, variando en un 210% y 227% respectivamente con respecto a las obtenidas *in vitro*, demostrándose con ello que las variaciones anatómicas de las plantas *in vitro* alteran la fisiología.

# **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **4.1. Ubicación de área experimental**

La presente investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Micropropagación de la carrera de Ingeniería Agrícola en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan (FES Cuautitlan) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ubicado en San Sebastián Xhala, municipio de Cuautitlan Izcalli, México.

La preparación de laminillas para la observación anatómica, se efectuó en el laboratorio de Anatomía Vegetal del Instituto de Recursos Naturales especialidad de Botánica del Colegio de Postgraduados, localizado en Montecillos, en el municipio de Texcoco, México.

#### **4.2. Material vegetativo**

Se utilizaron plantas de vid (*Vitis vinifera* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) y agave tequilero (*Agave tequilana* Weber cv. Azul) con metabolismo C-3, C-4 y MAC respectivamente. Se utilizaron plantas obtenidas *in vitro*, así como plantas con crecimiento en condiciones naturales, denominadas éstas últimas como plantas obtenidas *in vivo*.

##### **4.2.1. Fase *in vitro***

La fase *in vitro* se inició con la desinfección de tubos de ensaye, tapas, bisturís, cajas de Petri, agujas de disección y pinzas, que fueron lavados con agua y jabón y enseguida sometidos a un proceso de esterilización en autoclave a 15 PSI durante 30 min.

Paralelamente, se preparó el medio de cultivo, utilizando el propuesto por Cruz-Pizarro (2000), el cual fue elaborado con base a lo expuesto en el anexo 1 y 2.

Simultáneamente, se seleccionó el material vegetativo. En el caso de la vid se emplearon brotes de yema lateral; para el sorgo se utilizó la semilla; y finalmente, para el agave tequilero se usaron secciones de corona.

La desinfección superficial de las yemas, semillas y secciones de corona se realizó colocándolas por separado en vasos de precipitado y se lavaron con agua de la llave; en seguida se sumergieron en alcohol etílico-hipoclorito de sodio al 6% en dilución 1:9 de agua destilada esterilizada; cada paso durante 10 minutos en agitador magnético. Finalmente, fueron enjuagadas en un doble paso con agua destilada estéril dentro de la campana de flujo laminar.

Para la siembra de los explantes, se trabajó en una campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas, la cual fue desinfectada con alcohol 96°. A continuación, se tomó un explante proveniente de las yemas de vid, se colocó en la caja de Petri, eliminando el material innecesario con ayuda del bisturí y la fracción obtenida fue sembrada en un tubo de ensaye con medio de cultivo, desechando los residuos vegetales sobrantes y repitiendo la operación. El mismo proceso se repitió con las semillas de sorgo y los explantes de corona del agave.

Terminada la siembra, los tubos de ensaye fueron sellados con plástico *sella pack* y se colocaron en el cuarto de incubación a  $26 \pm 1$  °C de temperatura, con un fotoperiodo de 8 h

luz y 16 h de oscuridad, con una intensidad lumínica de  $47 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{seg}^{-1}$ ; la humedad relativa dentro de cada tubo fue del 100%.

#### **4.2.2. Material en condiciones naturales (*in vivo*)**

En el desarrollo de esta parte de la experimentación, se utilizaron plantas desarrolladas en sus condiciones normales, como se describe a continuación:

En el caso de las plantas de vid se emplearon estacas de 10 cm de longitud provenientes de la brotación de la primavera 2003, las cuales fueron conseguidas del huerto frutícola de la carrera de Ingeniería Agrícola, ubicado en la FES Cuautitlan, UNAM, en Cuautitlan Izcalli, Mex.

El *Sorghum bicolor* (L) Moench se obtuvo a partir de semillas germinadas en turba negra en una charola multicelada de polipropileno, la cual establecida en un invernadero de cristal tipo dos aguas, con ventilación lateral en la parte superior, ubicado también en la FES Cuautitlan.

Las plantas de agave tequilero analizadas fueron obtenidas a partir de hijuelos de 2 años de edad, de 10 cm de longitud, provenientes de una plantación comercial de agave azul, en el municipio de Tequila, Jal.

### **4.3. Observaciones Morfológicas y Anatómicas**

#### **4.3.1. Observaciones morfológicas**

##### **4.3.1.1. Métodos**

Para realizar la observación y descripción de las características morfológicas, se seleccionaron primeramente las plantas con caracteres bien definidos. En seguida, con ayuda de unas pinzas, fueron extraídos los explantes *in vitro* del tubo de ensaye y fueron colocados en cajas de Petri, en las cuales se adicionó agua para evitar la deshidratación. Este procedimiento se empleó en los explantes de *Vitis vinifera* L, *Sorghum bicolor* (L) Moench y *Agave tequilana* Weber cv. Azul, en el orden respectivo.

Para el caso de la vid *in vivo*, únicamente se colocó la estaca en la caja de Petri con agua. En el caso de las plántulas *in vivo* de las especies restantes, fue necesario remover el sustrato, retirándolo con ayuda de pinzas y agujas de disección, lavando inmediatamente la raíz al chorro del agua y se colocó en la caja de Petri para evitar la deshidratación.

Cada una de las especies tanto las de *in vitro* como las de *in vivo*, fueron observadas en un microscopio estereoscópico con un objetivo de 1X y de 3X, auxiliándose con un par de agujas de disección. La descripción de los diferentes órganos se sustentó en las claves morfológicas establecidas por Heywood, (1985). Para la caracterización de *Vitis vinifera* L., se utilizó como auxiliar la obra de Galleta (1990).

#### 4.3.1.2. Parámetros de evaluación

La caracterización morfológica de las plantas obtenidas, se hizo considerando la hoja, el tallo y la raíz (excepto en el caso de la vid *in vivo*) y para cada órgano, los parámetros de evaluación fueron los siguientes:

⇒ **Raíz.**

- Tipo de raíz.
- Ramificaciones.
- Cantidad.
- Pelos absorbentes.

⇒ **Tallo.**

- Tipo de tallo.
- Forma del tallo.
- Consistencia.
- Filotaxia.
- Tipo de inserción de hojas en el tallo.

⇒ **Hoja.**

- Tipo de hoja.
- Consistencia.
- Forma de la lámina.
- Tipo de margen.
- Forma del ápice.
- Forma de la base.
- Tipo de nervadura.
- Tipo de simetría.
- Dirección de las hojas.
- Postura transversal.

- Postura longitudinal.
- Coloración.
- Pubescencias.
- Textura del envés.

La descripción de las características morfológicas de las raíces, tallos y hojas se efectuó con la finalidad de observar y determinar la similitud entre las plantas obtenidas *in vitro* con las presentadas por las plantas desarrolladas en condiciones naturales.

#### **4.3.2. Observaciones anatómicas**

##### **4.3.2.1. Métodos**

Para la determinación anatómica solamente fueron consideradas las hojas, delimitando el área de estudio en la parte central de la hoja para la posterior preparación de laminillas permanentes. Las hojas se cortaron transversalmente y se fijaron en FAA (formaldehído, ácido acético, alcohol y agua) durante 24 h. Después se sometieron a un cambiador de muestras automático (Fisher Tissuemanton) donde se realizaron cinco pasos en cellosolve (50, 70, 100, 100 y 100%) cinco pasos en xileno al 100% por 6 h en cada cambio, dos pasos en parafina (55°C) por 12 h y posteriormente fueron colocadas en forma transversal en charolas de aluminio. Cada muestra se montó en taquete para realizar los cortes de 10 µm en un microtomo rotatorio American Optical 820 (Sass, 1968). En seguida se colocaron los cortes en portaobjetos previamente impregnados de adhesivo de Haup (gretina, fenol y glicerol) y formaldehído al 10%; después de escurrir el excedente de formaldehído por 3 h, se colocó en platina térmica a 55°C durante 24 h. Las preparaciones fueron pasadas por un

tren de desparafinado, que cuenta con tres pasos de xileno al 100% y cuatro pasos de alcohol (96, 96, 75 y 50%). De esta forma se prepararon para la tinción respectiva. Se realizaron laminillas por duplicado para cada unidad experimental: una para la visualización de lípidos para el estudio de la cutícula y una segunda para la detección de paredes celulósicas, lípidos, lignina, almidón y taninos.

Una preparación de cada unidad experimental se hizo una tinción, para lo cual se colocaron en un vaso de Coplin conteniendo rojo de aceite 7B (modificado por Engleman, comunicación personal). Esta tinción se basa en la mayor solubilidad del colorante en lípidos que el solvente en el cual está disuelto (propanol – etilenglicol) específica para cutícula y grasas. Las preparaciones se mantuvieron durante 24 h en el colorante y se montaron con jalea de glicerol.

La otra preparación de cada unidad experimental, se colocó en safranina acuosa (modificada por Engleman, comunicación personal) que es una tinción regresiva específica para paredes lignificadas, nucleolos, cromatina y taninos condensados, en cajas Coplin durante 24 h, después se pasaron por verde fijo, tinción progresiva específica para paredes celulósicas. Finalmente se montaron en resina.

#### **4.3.2.2. Parámetros de evaluación.**

Los parámetros de evaluación anatómica fueron:

⇒ **Grosor de cutícula.** Se determinó con un objetivo de 100X y un microscopio con cámara clara o brazo dibujador tomando veinte campos en varios cortes para obtener un promedio para cada especie.

⇒ **Caracterización de la epidermis.** Se observó con los objetivos 40X y 100X determinando la forma y distribución de las células del tejido epidérmico.

⇒ **Características de estomas.** Se realizó la observación al microscopio con un objetivo de 100X con la finalidad de apreciar adecuadamente las características de los mismos.

⇒ **Caracterización de mesófilo.** Se observó con los objetivos 10X, 40X y 100X determinando la forma y distribución de las células del tejido fundamental.

⇒ **Determinación de los haces vasculares.** Se observó con los objetivos 40X y 100X determinando:

- Número de elementos de vaso.
- Número de elementos de tubo criboso.

Los elementos de vaso se contabilizaron desde inmaduros con paredes engrosadas hasta con madurez total y para los tubos cribosos fueron contabilizados aquellos que presentaban células con la pared gruesa del parénquima y paredes angulosas, aunque tuvieran presencia de núcleos.

⇒ **Grado de madurez de los haces vasculares.** Se observaron de tres a cinco campos por muestra para obtener un valor promedio de la cuantificación de vasos y tubos cribosos, así como la forma de las células que los acompañan.

# **V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. Caracterización Morfológica**

Se determinó que la condición morfológica de las plantas de vid, sorgo y agave multiplicadas *in vitro* comparada con las desarrolladas en condiciones *in vivo*, es resultado de una condición genotípica igual, pues las manifestaciones fenotípicas apreciadas se corresponden en todas y cada una de las plantas, y en este punto, no se ven afectadas éstas características por efecto de las condiciones ambientales ni por la interacción del medio con el ambiente.

En general, se observó que las diferencias morfológicas encontradas entre las plantas *in vitro* y en las *in vivo*, se limitan en la postura de la hoja, la cual se encuentra muy posiblemente correlacionada positivamente con la estructura y posición de los plastidios y tiende a curvarse en condiciones de menor intensidad lumínica; y en la raíz, la diferencia primordial observada se limita a la ausencia de pelos radicales en las plantas obtenidas *in vitro*, como resultado de la abundancia de elementos nutrimentales en el medio y a que no resulta necesario para la planta extender la superficie de la raíz para ir en su búsqueda, como sucede en los sustratos naturales o comerciales.

En el cuadro 5, se resumen las diferencias morfológicas encontradas en las especies estudiadas, tanto en su condición *in vivo* como *in vitro*.

### 5.1.1. *Vitis vinifera* L

Los explantes de vid obtenidas a través del cultivo *in vitro* presentan de tres a cuatro raíces de tipo adventicio, las cuales nacen concéntricas en la base del tallo; son de gran longitud y solo presentan algunas raíces secundarias, formando un ángulo recto y carecen por completo de pelos radicales. En el caso de la planta *in vivo*, ésta presenta raíz pivotante o axonomorfa.

El tallo, tanto para las plantas multiplicadas *in vitro* como las desarrolladas *in vivo* es simple, es decir que no se ramifica, de forma cilíndrica y consistencia herbácea, aunque la base del tallo, es de consistencia semileñosa y el resto del tronco, en condiciones *in vivo* es completamente leñoso. La inserción de las hojas en el tallo es peciolada, pues cuenta con un peciolo que nace en la yema axilar. La filotaxia es alterna, con una hoja por nudo arreglada en espiral.

En lo referente a las hojas, *in vitro* e *in vivo*, son simples, es decir, que se forman de una sola lámina foliar la cual nace de una yema axilar, y presentan una consistencia herbácea. El limbo es cordado, con forma de corazón. El margen del limbo es palmeado lobado, con 3 lóbulos ligeramente marcados *in vitro* y de 5 muy claramente definidos en las hojas *in vivo*. El ápice es de tipo acuminado, es decir que presenta una punta prolongada *in vitro* y agudo (80°) *in vivo*; la base de la hoja es de tipo cordado, de corazón invertido. Las nervaduras presentes son palmeadas, pues posee 3 ó 5, respectivamente, venas principales digitadas o con forma de dedos. La simetría observada es zigomorfa, es decir, presenta un solo eje de

simetría vertical o bilateral. La dirección de las hojas es inclinada, formando con el tallo un ángulo agudo de 45°, aunque ocasionalmente llega a ser de tipo extendido, formando un ángulo recto con respecto al tallo. Sólo en las plantas *in vivo* se presentan estípulas o apéndices basales en forma de laminillas foliáceas que nacen al pie de los pedúnculos de las hojas; de este mismo punto, nacen otras hojas y aparecen opuestos a las hojas zarcillos o filamentos enrolladores, que constituyen modificaciones en las hojas. La postura transversal es recurvada y la postura longitudinal es revoluta. La textura de la superficie en el envés es resinosa. La coloración del haz de las plantas *in vitro* es verde claro intenso mientras que la del envés es exigua, y en condiciones *in vivo* estos colores se intensifican. El borde del limbo presenta forma lobada.

### **5.1.2. *Sorghum bicolor* (L) Moench**

En las plántulas de sorgo germinadas *in vitro*, la raíz principal es de tipo axonomorfa o pivotante, proveniente de semilla, razón por lo cual constituye aún parte de la radícula; presenta una ligera curvatura ascendente y posteriormente penetra al medio de cultivo, manifestando un marcado geotropismo positivo; también se presentan raíces fulcreas, naciendo de los nudos inferiores del tallo, con un comportamiento similar a la raíz principal; tanto la raíz principal como las fulcreas, carecen de pelos absorbentes y de ramificaciones. Contrastando, en condiciones *in vivo* la raíz es de tipo fasciculada, característica de las plantas monocotiledóneas, con numerosas raíces secundarias, de geotropismo positivo; presenta una raíz más gruesa que el resto, proveniente de la radícula

y varias raíces ligeramente más delgadas que parten desde el cuello de la raíz; también cuenta con raíces fulcreas; en ambos tipos se presentan pelos absorbentes y ramificaciones.

El tallo es simple, es decir que no se ramifica, de consistencia herbácea. Presentan filotaxia alterna, contando con una hoja por nudo arreglada en forma de espiral. La transición del tallo a la raíz es abultada, en forma de una pera.

Tanto *in vitro* como *in vivo*, las plantas de sorgo presentan hojas simples. Su consistencia es herbácea, con el limbo delgado. La forma del limbo es linear o falcada, alargada, estrecha y paralela. El margen es entero y liso. La forma de ápice es acuminada y la base se encuentra truncada o en forma recta, con la consecuente consecución de la lígula que abrazan al tallo, característica de las plantas de la familia *Poaceae*. La nerviación es paralela, es decir, las venas corren de extremo a extremo sin interceptarse; presenta una vena principal en la parte media, más gruesa que el resto, y aparentemente de tres a cuatro venas secundarias, equidistantes entre sí, de grosor medio y coloración menos intensa que la principal, pero mayor que el resto de las venas; en las estípulas las nervaduras se continúan equidistantes y el grosor se homogeniza. La coloración de la hoja es verde claro, tanto en el haz como en el envés. Únicamente en el envés de las hojas *in vivo* se presentan pubescencias. La postura transversal es ligeramente recurveada y la longitudinal es involuta en las plantas *in vitro*, mientras que *in vivo* tiene apariencia enrollada. Las hojas presentan un solo eje de simetría vertical. La apariencia de la superficie del envés es escobrosa.

### 5.1.3. *Agave tequilana* Weber cv. Azul

En el caso del agave, las plantas multiplicadas *in vitro* presentan raíces de tipo adventicias, abundantes y de gran longitud; presentan apariencia de anillado en toda su longitud y carecen por completo de pelos absorbentes. En cambio, *in vivo* son fibrosas, abundantes, de gran longitud; localizadas concéntricamente a la base del tallo, fuertemente ramificadas y con abundantes pelos radicales en la superficie.

Se trata de plantas acaulescentes, tanto los explantes multiplicados *in vitro* como los desarrollados en condiciones *in vivo*; es decir, carecen de tallo aparente. Sin embargo, la filotaxia de las hojas con respecto al tallo es arrosada, con una hoja por nudo arreglada en forma de espiral.

Los explantes de agave tequilero o azul, tanto las colocadas *in vitro* como las desarrolladas en condiciones naturales, presentan hojas simples, formadas por una sola lámina que nacen de una yema axilar. Su consistencia es carnosa o crasa, con un limbo grueso. La forma del limbo es linear, alargada, estrecha y paralela. El margen es doblemente aserrado, presentando dientes en diferentes direcciones alternadas: hacia abajo, hacia arriba y perpendiculares al borde, siendo estos últimos de menor tamaño en comparación con los dos primeros. La forma del ápice es caudado, con una prominente punta terminal, aún sin lignificarse en las plantas *in vivo*, mientras que la base es redondeada, con forma de media luna. Las nervaduras no se llegan a apreciar. *In vitro* la coloración del haz es verde claro, intensa, mientras que el envés en algunas hojas, sobre todos en las más antiguas, tiene de

ligeras a intensas coloraciones café a marrón, localizadas desde la base y desvaneciéndose conforme se aproximan al ápice; por su parte, en las plantas desarrolladas *in vivo* éstos colores se intensificaron a verde oscuro intenso en el haz y en el envés rojo o guinda con tonos grisáceos o cenizos. La postura transversal de las hojas es recurveada y la longitudinal varía de involuta hasta enrollada. Las hojas presentan un solo eje de simetría vertical. La apariencia de la superficie es espiculada.

**Cuadro 5. Diferencias morfológicas entre plantas obtenidas *in vivo* y multiplicadas *in vitro* de *Vitis vinifera* L, *Sorghum bicolor* (L) Moench y *Agave tequilana* Weber cv. Azul.**

CARACTERÍSTICAS	<i>Vitis vinifera</i> L		<i>Sorghum bicolor</i> (L) Moench.		<i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul	
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
<b>RAÍZ</b>	Axonomorfa o pivotante.	3-4 adventicias; algunas secundarias formando ángulo recto. Sin pelos absorbentes	Fasciculada, con numerosas raíces secundarias, ramificaciones y pelos absorbentes.	Axonomorfa o pivotante y fulcreas. Carecen de pelos absorbentes y ramificaciones.	Raíces fibrosas, abundantes, ramificadas. Presentan pelos absorbentes	Raíces adventicias, apariencia anillada. Carecen de pelos absorbentes
<b>TALLO</b>	Simple Leñoso	Simple Semileñoso.	Simple herbáceo	Simple Herbáceo	Acaulescente	Acaulescente
<b>HOJA</b>	Margen del limbo palmeado con 5 lóbulos muy marcados. Ápice agudo. Estípulas presentes. Presencia de zarcillos. Coloración verde intenso.	Margen palmeado 3 lóbulos poco marcados. Ápice acuminado. Ausencia de estípulas basales y zarcillos. Coloración verde claro.	Presencia de pubescencias en el envés. Postura de la hoja recurveada	Carente de pubescencias en el envés. Apariencia enrollada.	Ápice caudado con una prominente punta terminal. Coloración verde oscuro en el haz y rojizo en el envés.	Punta redondeada, en forma de media luna. Coloración verde claro.

## **5.2. Caracterización anatómica**

Con relación a la interpretación de los cortes, es importante destacar las recomendaciones emitidas por Ramos (2001), quien señala que al estudiar un corte histológico al microscopio, es preciso tener presente que la estructura de las células y los tejidos se ven alterados por el procesamiento histológico y que debe considerarse la posibilidad de que durante todo el proceso se hayan producidos artefactos, de allí la necesidad de contar con una adecuada interpretación en base a las variables de estudio.

### **5.2.1. *Vitis vinifera* L**

En el Cuadro 6, se resumen de forma general las diferencias anatómicas encontradas al comparar plantas de *V. vinifera* L obtenidas en condiciones naturales o *in vivo* con explantes de vid multiplicados *in vitro*. En él, se puede comprender de forma más clara que existen diferencias significativas en la estructura anatómica, siendo éstas el resultado de la acción de los factores ambientales en un mismo genotipo.

#### **5.2.1.1. Tejido Epidérmico.**

##### **5.2.1.1.1. Cutícula**

De acuerdo con la medición del grosor de la cutícula, se puede determinar que se mantiene una relación constante entre el grosor de la cutícula adaxial y abaxial de las plantas

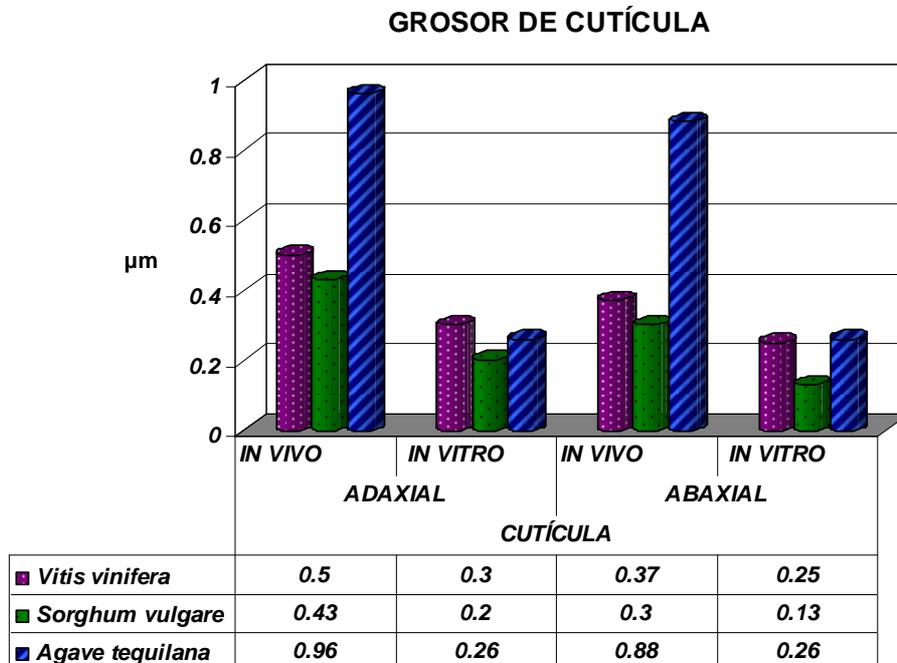
desarrolladas *in vivo* en comparación con las multiplicadas *in vitro*. En el caso de las plantas obtenidas *in vivo*, la cutícula adaxial mide 0.50  $\mu\text{m}$  y la abaxial 0.37  $\mu\text{m}$ , observándose una relación de 1:0.7 (Figura 1a).

En las plantas multiplicadas *in vitro*, la capa de cutícula adaxial mide 0.30  $\mu\text{m}$  y la abaxial 0.25  $\mu\text{m}$ , siendo una relación de 1:0.8, lo cual se observa en la Figura 1a'.

Al comparar la reducción de la epidermis abaxial de las hojas de plantas obtenidas *in vivo* con las multiplicadas *in vitro* es del orden promedio del 32%, pero la reducción en el grosor de la cutícula es mucho más evidente en lado abaxial, donde se reduce hasta el 40%; éstos porcentajes de reducción de la cutícula, pueden constituir un factor importante durante la fase de aclimatación de los explantes multiplicados *in vitro*, afectando el porcentaje de éxito en la fase de implementación en campo.

Los resultados de las tres especies estudiadas se pueden apreciar en el Grafico 1. En él se puede apreciar que la relación entre la cutícula adaxial y la abaxial se mantiene constante en las diferentes especies estudiadas, tanto *in vivo* como *in vitro*; sin embargo, al comparar las plantas obtenidas *in vivo* con las plantas multiplicadas *in vitro*, se observa claramente una reducción en ésta última condición, como resultado del incremento de la humedad relativa en el interior del tubo de ensaye.

**Gráfico 1. Grosor de cutícula (  $\mu\text{m}$  ) en hojas de plantas de *Vitis vinifera* L, *Sorghum bicolor* (L) Moench y *Agave tequilana* Weber cv. Azul, desarrolladas en condiciones *in vivo* y multiplicadas *in vitro*, teñidas con rojo de aceite 7 B.**



#### 5.2.1.1.2. *Epidermis*

Al observar la anatomía en hojas de vid, se encuentra una capa continua de células epidérmicas bien definida, tanto en la adaxial como en la abaxial presentando divisiones periclinales, dando una apariencia de tener células de diferente tamaño a lo largo de toda la lámina foliar, sin embargo, esta diferencia es debida a la etapa de telofase. En las plantas desarrolladas en condiciones naturales, en su parte adaxial, las células son iguales en tamaño y forma, de apariencia rectangular, de mayor tamaño a las abaxiales, mientras que en la parte abaxial el patrón de crecimiento de las células es isodiamétrico y de tamaño

uniforme y regular; el contorno de la hoja es uniforme, como puede observarse en la Figura 1b. Por su parte, en la Figura 1b', se observa que las células epidérmicas de las hoja *in vitro*, presentan variabilidad tanto en tamaño y forma, manifestando un patrón de crecimiento hacia el lado adaxial triangular mientras que en el abaxial tienden a ser alargadas, siendo de tamaño muy similar; el contorno es variable y sinuoso, apreciándose formaciones en forma de crestas y valles, siendo éstas muy marcadas como consecuencia de la forma de las células.

#### **5.2.1.1.3. Estomas**

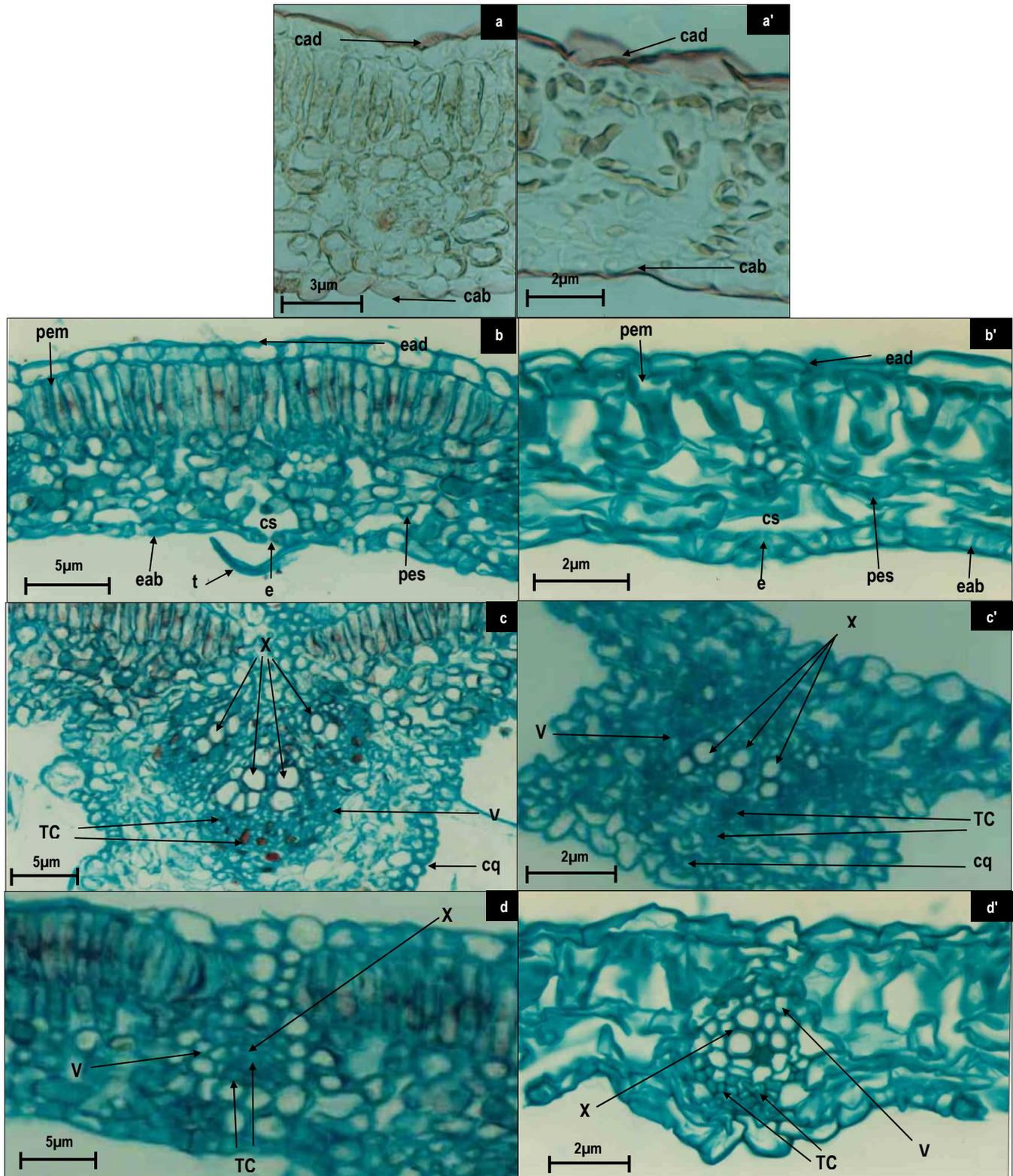
Los estomas aparece en el lado abaxial. Se encuentran bien desarrollados y se distinguen perfectamente las células oclusivas y las cámaras subestomáticas, con núcleos en aparente actividad meiótica, de mayor tamaño que las células epidérmicas aunque éste resulta variable, lo cual hace suponer que se trata de células mesógenas, es decir que tienen un origen común a las oclusivas a las cuales derivan. En el caso de las plantas desarrolladas en condiciones *in vivo*, en la Figura 1b se aprecia que las células anexas se distinguen perfectamente de las epidérmicas, con forma de pera, y las cámaras subestomáticas se encuentran perfectamente definidas, de forma alargada, ocupando el espacio de un estrato de células del parénquima esponjoso.

En tanto las células acompañantes de los estomas observados en las hojas multiplicadas *in vitro* presentan deformación, tienen una apariencia triangular, y no manifiestan un tamaño homogéneo entre sí, aunque es muy probable que como lo establece Huguette *et al.* (1993) en un estudio efectuado en hojas de rosa, que los estomas no sean funcionales. Por su

parte, es importante destacar que las cámaras subestomáticas se prolongan hasta la parte media del mesófilo, estando en contacto con las células del parénquima esponjoso (Figura 1b').

En cuanto a la apertura de estomas en la hoja desarrollada bajo condiciones normales, se aprecian en su mayoría cerrados, impidiendo la transpiración y pérdida de agua por transpiración, mientras que los de las hojas *in vitro* se aprecian abiertos en su mayoría, situación atribuible también a lo establecido por Bidwell (1979), quien asevera que a bajas concentraciones de CO<sub>2</sub>, se promueve la apertura estomática, aunado al incremento al 100% de la humedad relativa, con lo cual se incrementa la tasa de transpiración.

Una diferencia claramente marcada entre las plantas multiplicadas *in vitro* es la ausencia de tricomas en el envés de la hoja, puesto que la humedad relativa existente el medio es tan elevada, que resulta innecesario el desarrollo de estructuras modificadas en el envés de las hojas como estrategia para la captación de humedad ambiental, escasa en las condiciones de desarrollo normal de la uva. En las plantas multiplicadas *in vivo*, se observan en la Figura 1b, exclusivamente del lado abaxial; pelos simples, en diferentes estadios de madurez y diferenciación, mismos que se encuentran anexos a las células epidérmicas, constituyendo prolongaciones alargadas de éstas.



**Figura 1. Corte transversal en hoja de *V. vinifera* L.**

a. (cad) Grosor de cutícula adaxial y (cab) abaxial teñida con Rojo de Aceite 7B. b. Tejidos epidérmico y fundamental: (ead) epidermis adaxial y (eab) abaxial, (e) estomas, (cs) cámara subestomática, (t) tricoma, (pem) parénquima en empalizada y (pes) esponjoso. c. Venas principales. d. Venas secundarias: (V) vaina, (X) vasos de xilema y (TC) tubos cribosos, (cq) colénquima. <sup>1</sup> Multiplicada *in vivo*. <sup>2</sup> Multiplicada *in vitro*.

### **5.2.1.2. Tejido Fundamental.**

#### **5.2.1.2.1. *Parénquima en empalizada.***

Justamente por debajo del estrato epidérmico de la parte adaxial se encuentra perfectamente definido el parénquima en empalizada, siendo éste de una sola capa de células acomodadas verticalmente, alargadas y con núcleos laxos.

En el caso del parénquima de las hojas de plantas desarrolladas *in vivo*, la células son uniformes en cuanto a su tamaño y se encuentran perfectamente unidas, sin dejar espacios entre sí (Figura 1b). En cambio, *in vitro* no manifiestan uniformidad y se encuentran visiblemente separadas entre sí, apreciándose muy similar al parénquima esponjoso, como producto de una baja intensidad lumínica (Bidwell, 1979), pudiendo ser esta alteración anatómica, la responsable de la baja supervivencia en campo, tomando también en consideración el incremento de la humedad relativa, dado que la existencia y desarrollo del parénquima en empalizada es una respuesta a condiciones xeromórficas (Esau, 1982), siendo posible entender así el porqué de la alteración y fusión con el parénquima esponjoso en las hojas desarrolladas *in vitro* (Figura 1b').

#### **5.2.1.2.2. *Parénquima esponjoso***

Por debajo del parénquima en empalizada se encuentran el parénquima esponjoso; en él se aprecian espacios intercelulares, los cuales son los responsables de favorecer el intercambio gaseoso al interior del mesófilo. En el caso de las hojas de las plantas desarrolladas *in vivo*, se presentan células isodiamétricas, con núcleos densos, y en tamaño relativamente variable sin ser las diferencias demasiado heterogéneas, presentando cuatro estratos entre la

terminación del parénquima en empalizada y el estrato de células epidérmicas de la zona abaxial. En algunas células de éstos estratos se puede encontrar la formación de drusas en una conformación de estrella de cristales angulares y ocupando toda el área de la célula como se observa en la Figura 1b.

Por su parte, se observa en la Figura 1b', que en el caso de las plantas multiplicadas *in vitro*, éste último se encuentra conformado únicamente por dos capas de células igualmente amorfas pero ligeramente alargadas, acomodadas horizontalmente con respecto al crecimiento de la hoja; no se presentan grandes espacios intercelulares sino mas bien tienen una tendencia a dar una apariencia colapsada.

#### **5.2.1.3. Tejido Vascular.**

En cuanto a los haces vasculares, se tiene una conformación perfectamente definida donde se observa hacia la parte abaxial el floema y en su parte adaxial la formación del paquete de xilema; conteniendo un haz principal, de mayor tamaño, con células mas grandes, ubicado hacia la parte media de la hojas; en sus extremos y a lo largo de toda la lamina foliar, se presentan, en equidistancia relativamente regular haces más pequeños; todos ellos con una vaina del haz perfectamente definida la cual abarca el derredor de cada haz vascular y se prolonga hacia la parte adaxial de la hoja.

#### 5.2.1.3.1. Vena central.

Se encuentra ubicada en el centro del mesófilo, conformando un abultamiento, en el contorno general de la hoja. Hay una interrupción en la epidermis y en el parénquima en empalizada, cediendo su espacio a un conjunto de células de colénquima; hacia el lado abaxial, existe otro conjunto de células parenquimáticas. La vena central está protegida por células de parénquima y se encuentra rodeada por las células de la vaina del haz. Hacia el lado adaxial, se encuentran los vasos de xilema, separados simétricamente en paquetes equidistantes. Los tubos cribosos del floema se encuentran anexos a los paquetes de xilema. Se encuentra ubicado hacia el lado abaxial, una serie de elementos cribosos de protofloema, en una formación conoidal, justamente debajo del metaxilema. En la parte superior, ubicadas justamente entre el meta y el protoxilema, se localiza el cambium vascular.

Sin embargo, como en lo descrito en los tejidos anteriores, existen diferencias importantes en cuanto a la forma y cantidad de células entre las plantas desarrolladas en condiciones *in vivo* y las plantas multiplicadas *in vitro*. En las primeras, el abultamiento de la vaina central es semicircular mientras que en las segundas es cuadrangular; *in vivo* el colénquima presenta células redondas, isodiamétricas, muy unidas en 4 hileras y colocadas en 5 estratos mientras que *in vitro* forman una masa celular amorfa, de tendencia rectangular dividida en tres estratos. Existen también diferencias en el parénquima localizado hacia el lado abaxial: en las hojas de plantas desarrolladas *in vivo* se presentan seis estratos de células de parénquima de forma ovalada, de tamaño regular, más grandes que las existentes en el parénquima esponjoso del mesófilo, dando la formación semicircular antes mencionada (Figura 1c), mientras que en el caso de las hojas de plantas multiplicadas *in vitro*, las células

del parénquima se encuentran colapsadas, de forma cuadrangular, con bordes irregulares y sin uniformidad en cuanto a su tamaño entre si (Figura 1c').

En cuanto a los haces vasculares, también se presentan diferencias: en el primer caso, se observa en la Figura 1c, que se desarrollan en promedio cuatro paquetes xilema: dos superiores, colocados en hileras, en posiciones diagonales y dirigidas hacia el interior de la hoja cada uno, formado de tres células en lado izquierdo y dos células en el lado derecho, de forma isodiamétrica, redondas, de tamaño regular; los otros dos paquetes, están colocados en la parte central de la vaina, justamente a la mitad de los superiores, separados equidistantemente, formados en hilera, por células redondas, isodiamétricas que incrementan ligeramente su tamaño hacia el lado abaxial; el paquete izquierdo esta constituido por tres células mientras que el derecho, por cinco células, siendo las dos primeras hacia el lado adaxial redondas, similares a las del otro paquete, y las tres últimas, se encuentran ubicadas horizontalmente, de forma trapezoidal y estrechas; se presentan en promedio 108 células floemáticas semicuboidales, muy unidas entre si, ubicadas hacia el lado abaxial, rodeando las células protoxilemáticas.

En el caso de las plantas multiplicadas *in vitro*, existen tres paquetes de metaxilema ubicados centralmente, se encuentran en una formación trapezoidal: hay un paquete en la parte media, de gran tamaño conformado por tres células xilemáticas, los otros dos paquetes de xilema son de menor tamaño y se encuentran ubicados simétricamente, formados en promedio de una célula protoxilemática; rodeando al xilema se encuentran distribuidas equitativamente, un grupo de 66 células de mucho menor tamaño, colapsadas, de tamaño regular y forma de cuboidal, conformando el protofloema. El cámbium

vascular *in vivo* es de 29 células mientras que *in vitro* son 18, conformando un ángulo aproximado de 110° (Figura 1c').

La vaina del haz se encuentra protegiendo a la vena central con un conjunto de 30 células de mayor tamaño que el parénquima anexo, unidas en forma circular, laxas, en el caso de las hojas de plantas obtenidas *in vivo*, mientras que en las multiplicadas *in vitro* se desarrolla una capa de 26 células irregulares, amorfas y de tamaño variable constituyendo la vaina del haz, difiriendo del parénquima por su tamaño y forma.

La apariencia de la hoja desarrollada *in vitro* muestra una apariencia cuboidal, similar a lo también descrito por Cruz-Pizarro (2000), quien menciona un arreglo diferente del tejido vascular en hojas vitrificadas, igualmente en un estudio *in vivo*; asimismo, señala que se forman varios haces colaterales dispersos, ordenados en una forma más o menos concéntrica.

Igualmente, Cruz-Pizarro (2000) destaca que el tejido fundamental de la vena media está constituido por abundantes células de parénquima, cuyo tamaño está más relacionado con las hojas de campo que con las grandes células colapsadas de las hojas *in vitro*, pero señala que las paredes son delgadas y también presentan colapso, tal y como se aprecia en este estudio.

#### **5.2.1.3.2. Venas secundarias.**

Las venas secundarias se encuentran equidistantes a lo largo del limbo foliar. Se caracterizan por presentar un grupo de células que interrumpen la continuidad del

parénquima esponjoso, conformando un anillo o vaina, la cual rodea al sistema vascular. Tienen los vasos de xilema colocados en la parte central, y anexos se encuentra el floema, conformado por células bien definidas, de menor tamaño con relación a las del xilema. Hacia el lado abaxial, se forma una capa de colénquima, con células de mayor tamaño con relación a las de la vaina.

Como ocurre con las venas principales, las secundarias muestran diferencias al compararse entre *in vivo* e *in vitro*. En el caso de las primeras, la vaina se encuentra conformada por un conjunto de 16 células redondas, cinco vasos de xilema, de células redondas, isodiamétricas, un conjunto de 46 tubos cribosos de floema, cuyas células son redondas e isodiamétricas y las células del colénquima son de forma redonda, isodiamétricos, lo cual se observa en la Figura 1d. En cambio, *in vitro*, en la Figura 1d' se observan 14 células de mayor tamaño, amorfas que conforman la vaina, tres células de xilema ovaladas, de mayor tamaño, 15 células de protofloema y el colénquima es amorfo hacia el haz y ensanchándose hacia el envés de la hoja.

#### **5.2.1.3.3. Venas terciarias.**

Éstas se encuentran a lo largo de toda la hoja, intermedias entre las venas secundarias y la principal indistintamente. Se encuentran formadas por células protofloemáticas, aun no bien desarrolladas de mayor tamaño, con una tendencia al engrosamiento, circundadas por una capa de células que conforman la vaina del haz, la cual envuelve las células floemáticas.

Las diferencias *in vivo* e *in vitro* radican en la cantidad de células: tres células protoxilemáticas, 12 células floemáticas y diez células conformando la vaina del haz, en el caso de las hojas de plantas obtenidas *in vivo*; mientras que *in vitro* se observa una sola célula protoxilemática, una profloemática en promedio y la vaina del haz esta formada por un conjunto capa de cinco células.

### **5.2.2. *Sorghum bicolor* (L) Moench**

En el Cuadro 6, se encuentran resumidas las diferencias anatómicas de las plantas de *S. bicolor* (L) Moench obtenidas *in vivo* y de las multiplicados *in vitro*.

#### **5.2.2.1. Tejido Epidérmico.**

##### **5.2.2.1.1. Cutícula**

La cutícula adaxial de las hojas de plantas obtenidas *in vivo* presenta un grosor 0.43  $\mu\text{m}$  mientras que la abaxial 0.30  $\mu\text{m}$ , lo cual implica una relación de 1:0.7 entre ambas (Figura 2a). En el caso de las plantas multiplicadas *in vitro*, los valores corresponden a 0.20  $\mu\text{m}$  y 0.13  $\mu\text{m}$  respectivamente para las cutículas adaxial y abaxial, expresando una relación entre éstas de 1: 0.6 (Figura 2a').

Sin embargo, pese a que se mantiene una relación muy similar entre la cutícula adaxial y abaxial tanto en las plantas obtenidas *in vivo* como las desarrolladas *in vitro*, lo cual se puede explicar como una condición genética de los materiales, resulta evidente la reducción

superior al 50% de ceras epicuticulares, pudiendo provocar dicha condición, el aumento del estrés durante la fase de aclimatación de plantas con características similares.

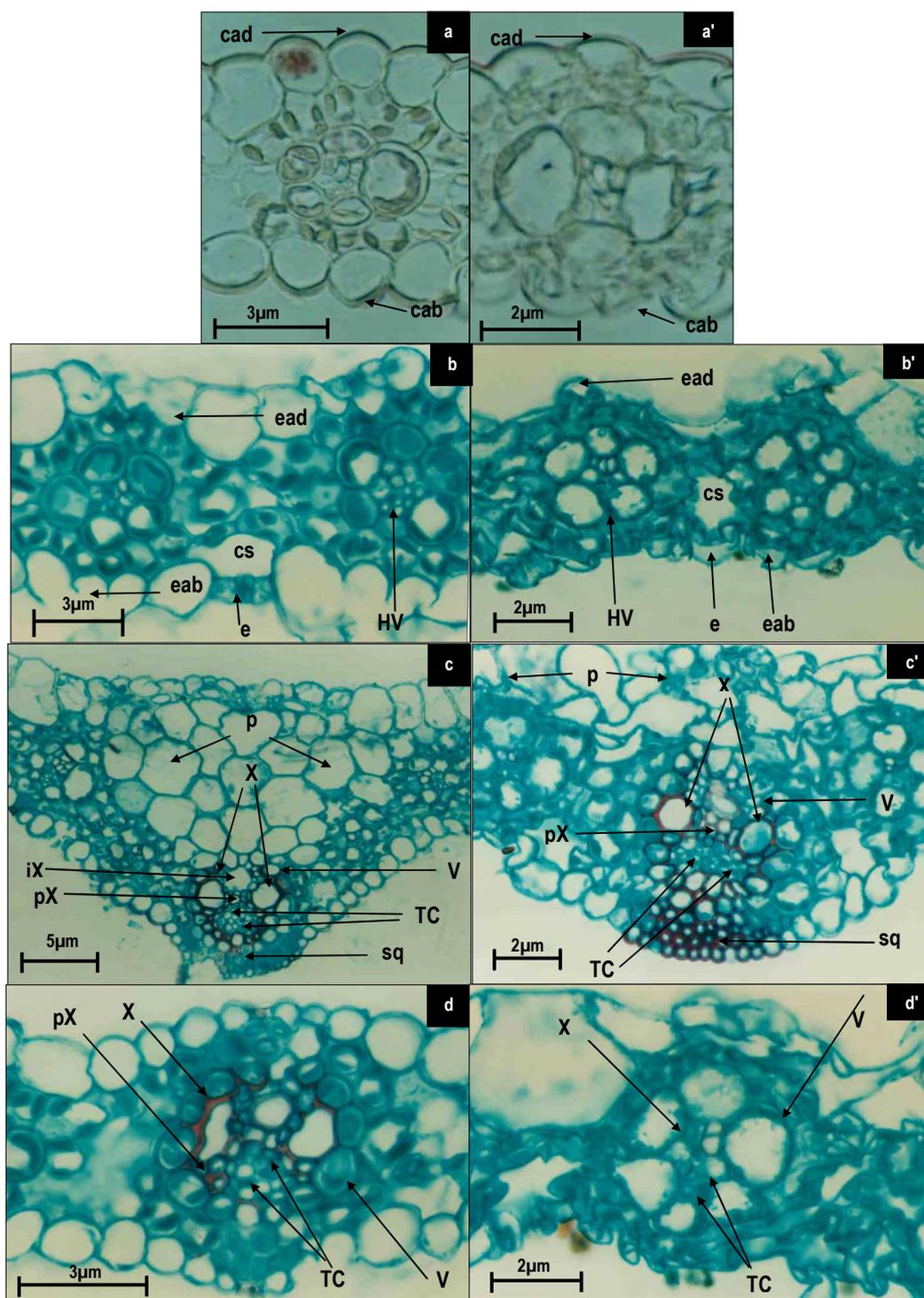
#### **5.2.2.1.2. Epidermis**

La epidermis tanto adaxial como abaxial se encuentra conformada por una capa de células muy unidas entre sí. Se aprecia un tamaño similar en el tamaño y forma de las células en ambas caras de la hoja de sorgo.

En las plantas obtenidas *in vivo*, éstas células son buliformes y de tamaño regular, homogéneas entre sí, como se observa en la Figura 2b; mientras que en las hojas de plantas multiplicadas *in vitro*, se observa en la Figura 2b', que las células epidérmicas encuentran visiblemente deformada, alargadas, de tamaño heterogéneo, sin conformar un límite delineado, lo cual se aprecia en el contorno general de la hoja como crestas y valles, observándose sobre todo en el lugar donde se ubican los haces.

#### **5.2.2.1.3. Estomas**

Los estomas se observan exclusivamente hacia el lado abaxial de la hoja. Se distinguen perfectamente de las células epidérmicas tanto por su tamaño como por su división periclinal; se presentan células acompañante, y se aprecian las cámaras subesomáticas.



**Figura 2. Corte transversal en hoja de *S. bicolor* (L) Moench.**

a. Grosor de cutícula - (cad) adaxial y (cab) abaxial - teñida con rojo de aceite 7B. b. Tejidos epidérmico y fundamental teñidos con safranina verde fijo. (ead) Epidermis adaxial y (eab) abaxial, (e) estomas, (cs) cámara subestomática, (p) parénquima, y (HV) haz vascular c. Venas principales. d. Venas secundarias: (V) vaina del haz, (X) xilema, (pX) protoxilema, (iX) espacio interxilemático, (TC) tubos cribosos y (sq) esclerénquima. <sup>1</sup> Multiplicada *in vivo*. <sup>2</sup> Multiplicada *in vitro*.

En la Figura 2b, se pueden observar las hojas de sorgo desarrolladas *in vivo*, las células acompañantes se distinguen por ser de menor tamaño; cámaras subesomáticas profundas y bien definidas, que pueden llegar hasta la mitad del mesófilo. En las hojas de plantas multiplicadas *in vitro*, en cambio se encuentran muy deformados, y se encuentran poco diferenciados de las células epidérmicas y tienen una apariencia completamente amorfa; las cámaras subestomáticas no se encuentran definidas ocupando en su totalidad el área del mesófilo, tal como se puede observar en la Figura 2b’.

Los estomas observados en las plantas desarrolladas en condiciones *in vivo* se encuentran en su mayoría cerrados, dada la condición ambiental de una planta resistente a la sequía, que impide la apertura excesiva de estomas con la finalidad de reducir la transpiración del vegetal y con ello la pérdida de agua de las estructuras celulares. Por su parte, en la condición *in vitro* es posible apreciarlos abiertos, aunque no en su mayoría.

#### **5.2.2.2. Tejido Fundamental.**

La hoja del sorgo, corresponde anatómicamente a las típicas características de las gramíneas C-4, es decir, plantas con una elevada capacidad fotosintética en la cual no se diferencia el parénquima del mesófilo, mismo que se encuentra constituido por células parenquimáticas, con una apariencia equifaciada. Este estrato se encuentra claramente delimitado por dos capas epidérmicas.

*In vivo*, se aprecian tres capas de células redondeadas, isodiamétricas, de núcleos densos, perfectamente unidas entre sí, pero con algunos espacios intercelulares, principalmente

hacia el centro de la hoja (Figura 2b). En cambio, *in vitro*, se observan solamente dos capas de células de parénquima en el mesófilo, visiblemente colapsadas, de tendencia alargada y conformando numerosos espacios intercelulares (Figura 2b').

### **5.2.2.3. Tejido Vascular.**

Con referencia a los haces vasculares, se aprecian perfectamente equidistantes entre sí a lo largo de toda la lámina foliar, correlacionado con la nervadura paralelinerve de la hoja del sorgo.

#### **5.2.2.3.1. Vena central.**

El haz central de la hoja de sorgo se ubica en la parte media; en este punto, el contorno de la hoja forma un seno, por encima del cual se forma un ensanchamiento del parénquima, con células muy grandes y muy unidas entre sí, las cuales dan una apariencia de desplazar hacia el envés el haz vascular, hacia el lado abaxial, se encuentra protegido por tres capas de células de esclerénquima, claramente engrosadas, de paredes muy gruesas pero no lignificadas. El haz vascular se encuentra protegido exteriormente por un conjunto de células, conformando un área circular; hacia el interior de él, se observan los vasos de xilema ubicadas centralmente hacia el lado adaxial de la hoja y hacia el lado abaxial, se forma un haz de células protoxilemáticas y circundantes a éstas se aprecian los tubos cribosos de floema, formado por células laxas, mas pequeñas y unidas.

En el caso de las plantas obtenidas *in vivo*, el conjunto de vasos de xilema esta formada por dos células metaxilemáticas, con un espacio interxilemático, redondeadas, isodiamétricas,

de evidente mayor tamaño que abarcan casi el 50% del lugar ocupado por el haz vascular; hacia el lado abaxial, se forma un haz de 17 células protoxilemáticas circundantes a un conjunto de 28 células laxas, más pequeñas y muy unidas entre sí, las cuales conforman los tubos cribosos del floema, mismas que se encuentran en constante multiplicación. Circundando a las células vasculares, se encuentra un conjunto de 22 células que conforman la vaina del haz; éstas son visiblemente más grandes que las del resto del parénquima, de forma redondeada e isodiamétrica hacia el envés pero ovalándose hacia el lado adaxial. Hacia el lado abaxial, se observa un conjunto de 40 células de esclerénquima redondas, de tamaño uniforme, lignificadas. En la Figura 2c se observan éstas características.

En cambio, en el caso de las hojas de plantas multiplicadas *in vitro*, se presenta solamente un ligero ensanchamiento del mesófilo, sin ser demasiado evidente; se encuentra protegida hacia el envés por una capa desorganizada de 32 células de esclerénquima y hacia el haz por dos capas de parénquima amorfo muy alargadas, de apariencia lagunar, separadas entre sí. Con referencia a los vasos, se hallan tres células metaxilemáticas, de cuya distribución no siempre es visiblemente simétrica, ligeramente ovaladas, de mayor tamaño hacia el lado adaxial de la hoja; formando una conexión, se aprecia una hilera desorganizada de diez células amorfas, alargadas, de tamaño intermedio al compararlas con las células cribosas, conformando el resto del protoxilema. Hacia el lado abaxial, circundado en la parte superior por este puente xilemático y hacia la parte inferior por la vaina del haz, se encuentra un grupo de 13 células pequeñas, ligeramente redondeadas, algunas amorfas, desorganizadas y relativamente unidas, las cuales constituyen el floema. A diferencia de la hoja normal, en las hojas de sorgo desarrolladas *in vitro*, se aprecia un haz superior, entre el

metaxilema, de seis células floemáticas. Circundando a las células vasculares, se ubica la vaina del haz, que en promedio presenta 20 células, más grandes que las del resto del parénquima pero de forma variable, siendo más grandes y alargadas hacia el haz y más redondeadas y unidas hacia el envés (Figura 2c').

Pese a esta diferencia en el número de células, la relación xilema a floema se en ambas condiciones de desarrollo es, en 1:1.5, es decir que por cada vaso xilemático existe un tubo criboso y medio; dicha relación, pese a ser constante, quizá por una cuestión genotípica, la distribución es diferente, siendo mas amplia en las hojas desarrolladas *in vitro*, muy probablemente por que en dicha condición, el movimiento de nutrimentos suele ser más activo y dinámico en contraste con las plantas desarrolladas bajo condiciones naturales.

#### **5.2.2.3.2. Venas secundarias.**

La apariencia de las venas secundarias es muy similar a la central, solo que éstas son de menor tamaño y se encuentran distribuidas equitativa y equidistantemente unas de otras a lo largo del mesófilo de la hoja. La estructura general consiste en dos células de xilema mas un espacio interxilemático hacia el haz mientras q hacia el envés se observan los tubos cribosos del floema. En forma circundante, se observan un conjunto de células que conforman la vaina del haz. Hacia ambos lados de la hoja, se encuentra protegida la vena secundaria por un conjunto de células correspondientes a las fibras de esclerénquima, ubicadas en dos hileras distribuidas uniforme y equitativamente, otorgando sostén y protección al sistema vascular.

En las hojas de plantas obtenidas *in vivo*, las células del metaxilema son redondas, asimétricas, ligeramente ovaladas, de mayor tamaño; así mismo, se aprecia un puente de cinco células de protoxilema, que son redondeadas a cuboidales, isodiamétricas pero de menor tamaño; éste grupo de células se encuentran ubicadas al centro del haz y ligeramente corridas hacia el haz, ocupando un 50% del tamaño del haz vascular; los tubos cribosos del floema forman un grupo compacto de 15 células, de forma ovalada (Figura 2d). Alrededor de la vena, se encuentra la vaina del haz, conformada por 20 células. El esclerénquima esta formado con un conjunto de seis estratos de células.

En el caso de las hojas de plantas multiplicadas *in vitro*, el xilema se encuentra constituido por tres células de mayor tamaño, colocadas asimétricamente dentro del vaso y en la parte central, se halla un espacio interxilemático, anexo al cual se observan células floemáticas, aunque éste mas bien se encuentra ubicado en el centro inferior del haz, conformado por 22 tubos cribosos, de tamaño muy pequeño, muy unidos entre sí, con núcleos muy densos y en constante actividad mitótica. Hacia el lado adaxial de la hoja, la vena se encuentra protegida por otro grupo de seis células de esclerénquima. Se encuentra protegida por 17 células que forman una vaina, cuyas células son de tamaño variable, redondeadas hacia el haz mientras que hacia el envés el tamaño y forma disminuyen considerablemente, conjugándose con un grupo de siete células de esclerénquima, redondas, de pared muy engrosada, que cumplen la función de proteger a la vena y otorgar resistencia (Figura 2d').

#### **5.2.2.3.3. Venas terciarias.**

Estas son particularmente mas pequeñas y equidistantes entre sí, ubicadas en la parte central del mesófilo, pero se distinguen del resto de las nervaduras porque las seis células

de la vaina del haz son bastante abombadas, abarcando casi la totalidad del mesófilo de la hoja. Al centro, se hallan un grupo compacto de ocho tubos cribosos, de forma redonda e isodiamétrica, muy unidos entre si; y se observan muy poco desarrolladas, dos vasos de xilema, de tamaño ligeramente mayor al floema, ubicados hacia el haz de la hoja, como en los vasos mas desarrollados.

### **5.2.3. *Agave tequilana* Weber cv. Azul**

Las diferencias anatómicas de las plantas de *A. Tequilana* Weber cv. *Azul*, se encuentran resumidas en el Cuadro 6.

#### **5.2.3.1. Tejido epidérmico**

##### **5.2.3.1.1. Cutícula**

Las plantas obtenidas *in vivo*, se encuentran protegidas por una gruesa capa de cutina en ambas capas epidérmicas (Figura 3a), de un espesor estimado en el haz de 0.96  $\mu\text{m}$ , la cual protege de la transpiración en condiciones naturales, apreciándose también las crestas aserradas en la epidermis, mientras que la capa abaxial de cutícula es igualmente muy gruesa, de 0.88  $\mu\text{m}$  existiendo con ello una relación 1:0.9 entre cutícula adaxial y abaxial.

En el caso de las hojas de plantas multiplicadas *in vitro*, la capa de cutina, que puede apreciarse en la Figura 3a', tiene un espesor estimado de 0.26  $\mu\text{m}$  tanto hacia el lado adaxial como el abaxial, existiendo con ello una relación 1:1 entre cutícula adaxial y

abaxial, situación muy similar a la observada en las plantas obtenidas *in vivo*, lo cual significa una reducción del 73% de la cutina adaxial y 70% de la abaxial, al ser comparada con las plantas obtenidas *in vivo*.

El hecho que la relación entre cutículas adaxial y abaxial tanto *in vivo* como *in vitro* sea similar, hace suponer que la planta responde a una condición genética, misma que se ve modificada por las condiciones ambientales en las cuales se desarrolló la planta *in vitro*.

#### **5.2.3.1.2. Epidermis.**

El mesófilo del agave, se encuentran delimitada por una capa de células unidas conformando una capa continua de células hacia el lado adaxial, y hacia el abaxial, se aprecia otra capa celular, igualmente continua, constituyendo la epidermis.

En el caso de las plantas obtenidas *in vivo*, se aprecia un contorno bien delimitado y uniforme; las células epidérmicas adaxiales son aplanadas, alargadas, pequeñas y muy unidas entre sí; hacia el lado abaxial, las células son mas bien redondas, ligeramente recortadas e isodiamétricos (Figura 3b). En cambio, en las hojas de plantas multiplicadas *in vitro*, tienen una apariencia irregular, pues los límites de la hoja manifiestan marcadas crestas y ondulaciones a lo largo del borde; las células epidérmicas adaxiales tiene una forma semicircular, diferentes en cuanto a su tamaño entre sí; las células epidérmicas abaxiales son amorfas, ligeramente alargadas y en algunas secciones son mas transversales que aplanadas (Figura 3b').

#### **5.2.3.1.3. Estomas.**

Los estomas se aprecian y distingue tanto en el haz como en el envés, cuyas células acompañantes son de tamaño y forma similar a las epidérmicas, ligeramente hundidos; las células estomáticas se encuentran perfectamente definidas, de tamaño pequeño, compacto, densas, cuneiformes, se encuentran ligeramente hundidos; las cámaras subestomáticas son muy reducidas, apreciándose la capa de cutina sobre éstas.

En el caso de las hojas de plantas obtenidas *in vivo*, en la Figura 3c, se observan las células acompañantes son rectangulares y alargadas; los estomas se encuentran ligeramente hundidos, las células oclusivas se observan perfectamente definidas, con forma arriñonada; se aprecian cerrados en lo general; y las cámaras subestomáticas son muy pequeñas.

En las plantas multiplicadas *in vitro*, en la Figura 3c', los estomas se encuentran ligeramente hundidos en algunos casos, pero la mayoría se encuentra al nivel de la epidermis; se aprecian las células acompañantes amorfa aunque son más grandes que las células epidérmicas; las células oclusivas también se encuentran modificadas en forma traingular. Aunque en su mayoría se aprecian cerrados, hay más estomas abiertos que en la condición *in vivo*.

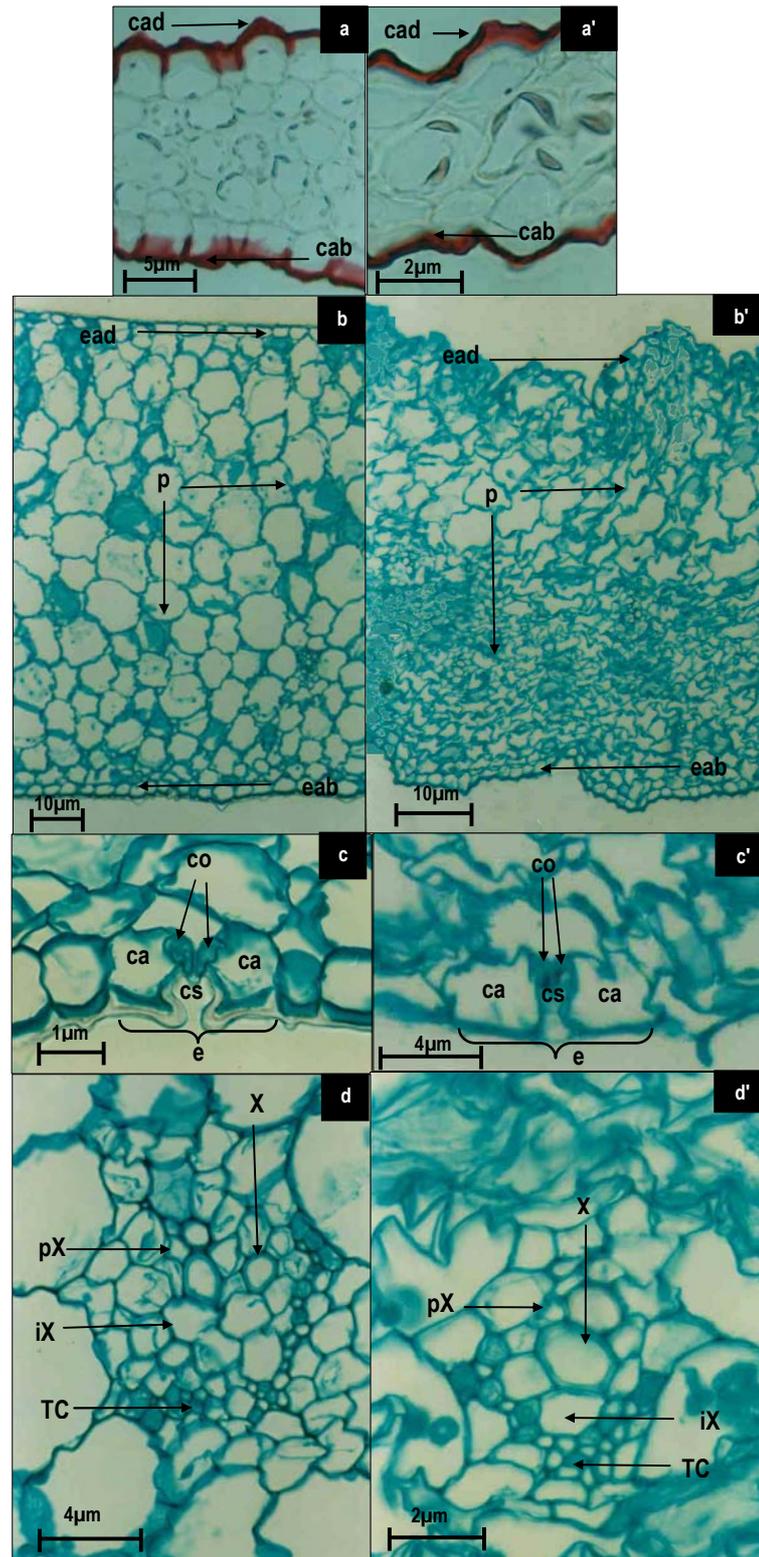


Figura 3. Corte transversal en hoja de *A. tequilana* Weber cv. Azul.

a. Grosor de cutícula tenida con rojo de aceite 7B: (cad) capa de cutina adaxial y (cab) abaxial. b. Tejidos epidérmico y fundamental teñidos con safranina verde fijo: (ead) epidermis adaxial, (eab) abaxial y (p) parénquima c. (e) Estoma, (cs) cámara subestomática, (ca) células anexas y (co) células oclusivas. d. Venas principales. (X) xilema, (pX) protoxilema, (iX) espacios interxilemáticos y (TC) tubos cribosos. <sup>1</sup> Multiplicada *in vivo*. <sup>2</sup> Multiplicada *in vitro*.

### **5.2.3.2. Tejido fundamental.**

En el mesófilo, se aprecian un solo conjunto de células parenquimáticas, grandes, dada la función de servir de almacenamiento de agua en condiciones de sequía extrema, son de apariencia lagunar, muy unidas entre sí, lo cual le otorga una apariencia equifaciada.

En el caso de las plantas obtenidas *in vivo*, se observan 12 estratos de este parénquima (Figura 3b), mientras que en las multiplicadas *in vitro*, se pueden apreciar hacia el lado adaxial, hasta cuatro estratos de células parenquimáticas, de gran tamaño, de forma lagunar, muy unidas entre sí; mientras que hacia el lado abaxial, abarcando dos terceras partes del mesófilo, se aprecia otro conjunto de 12 estratos de células parenquimáticas, igualmente muy unidas entre sí, colapsadas, cuya forma tiene una tendencia alargada, amorfas, siendo únicamente dentro de esta parte del mesófilo, la región donde se ubica el sistema vascular en su totalidad (Figura 3b'). Esta diferencia puede entenderse, como lo indica Ramos (2001) debido a una desecación al momento de realizarse el corte histológico, lo que si resulta destacable es el incremento en el número de estratos del mesófilo, probablemente por el incremento de agua del sustrato.

### **5.2.3.3. Tejido vascular.**

#### **5.2.3.3.1. Vena central**

En el caso de las hojas de agave, no sobresale ninguna vena en particular, son de tamaño relativamente igual, equidistantes entre sí y distribuidas en la parte media del mesófilo; solamente se distinguen de las secundarias por su ubicación intermedia y la posición desplazada hacia la parte abaxial de la hoja.

En las hojas de agave, el haz vascular esta delimitado por un conjunto de células en forma semicircular; ubicadas en el centro, hacia el lado adaxial, se aprecian el xilema, conformado una estructura cruciforme en la parte central del haz, formados por células ovaladas, de pared engrosada, simétricas; rodeando la célula mas adaxial, se encuentra un conjunto células protoxilemáticas, asimismo se observan espacios intercelulares que era ocupado por el xilema, lo cual refuerza la condición genética de las especies vegetales MAC de poseer grandes células xilemáticas, capaces de absorber una gran cantidad de agua, misma que será almacenada como reserva para ser empleada en condiciones de estrés hídrico. Hacia el lado abaxial de éstas, se encuentra el floema constituido por un grupo de células, de menor tamaño en comparación con las de xilema, de forma cuadrangular.

En las hojas de plantas obtenidas *in vivo*, el haz esta formado por 19 células conformando una elipse, son irregulares en su forma, apariencia lagunar y de aspecto muy similar a las del parénquima; los vasos de xilema están formados por cuatro células xilemáticas, y otras seis células cuboidales, simétricas y de tamaño un tercio menor que las del metaxilema y seis espacios interxilemáticos; el floema esta conformado por un conjunto de 24 tubos cribosos (Figura 3d).

Por su parte, las plantas multiplicadas *in vitro*, como se observa en la Figura 3d', la vaina central se encuentra formada por conjunto de 15 células, amorfas, irregulares, ligeramente alargadas, de aspecto muy similar a las del parénquima anexo; tres vasos de xilema, siendo de forma redondeada y con pared celular claramente engrosada, simétricas; por debajo otras

tres células de protoxilema, de menor tamaño y con las mismas características y un espacio interxilemático; se presentan también 15 células floemáticas.

En términos generales, se aprecia una reducción en la cantidad de células entre las plantas desarrolladas *in vivo* en comparación con las plantas multiplicadas *in vitro*, pero manteniéndose una relación constante entre los vasos de xilema y los tubos cribosos del floema, respondiendo a la condición genotípica de la especie, pero expresándose el efecto del ambiente modificado en la cantidad de células. Éste hecho en particular, puede responder a las particularidades de las plantas MAC, cuya capacidad para aprovechar mínimas cantidades de agua se vio afectada por la alta disponibilidad de este elemento dentro de la solución nutritiva, coincidiendo a lo encontrado por Guerrero (2000), quien menciona una reducción en el número de vasos del sistema de conducción.

#### **5.2.3.3.2. Venas secundarias.**

Los haces vasculares secundarios se ubican igualmente en la parte central del mesófilo, equidistantes entre sí, siendo de menor tamaño con relación a las venas centrales. Se distingue un grupo de células rodeando circularmente al haz, de apariencia lagunar, muy similares las del parénquima; los vasos de xilema son ovalados, de mayor tamaño, distribuidas en hacia el centro de la vena, colocadas en forma piramidal; un conjunto anexo de protoxilema, anexas, así como algunas cavidades xilemáticas; hacia el lado abaxial de la vena, se ubican un grupo de células ovaladas, y mucho más pequeñas que conforman los tubos cribosos.

En las hojas de plantas desarrolladas *in vivo*, se observan 19 células grandes conforman la vaina; tres vasos de xilema, diez células protoxilemáticas; y 22 células de tubos cribosos.

En las hojas de plantas multiplicadas *in vitro*, se aprecian 13 células de la vaina; dos vasos de xilema, tres células protoxilemáticas y algunas cavidades xilemáticas; y un conjunto de 22 células de floema.

#### **5.2.3.3.2. Venas terciarias.**

La estructura y forma de las células es la misma que en las venas primarias y secundarias, pero de menor tamaño. En la condición *in vivo*, se observan tres células xilemáticas, tres protoxilemáticas y 13 células floemáticas, rodeadas por 16 células que conforman la vaina.

*In vitro*, se ven dos células xilemáticas, dos protoxilemáticas, 10 protofloemáticas ligeramente cuadriformes, y la vaina se encuentra protegida por cuatro células del mesoderma.

**Cuadro 6. Diferencias anatómicas entre plantas de *Vitis vinifera* L., *Sorghum bicolor* (L) Moench y *Agave tequilana* Weber cv. Azul obtenidas *in vivo* y multiplicadas *in vitro*.**

PLANTA CARACTERÍSTICAS	<i>Vitis vinifera</i> L		<i>Sorghum bicolor</i> (L) Moench.		<i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul	
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
<b>EPIDERMIS ADAXIAL</b>	Contorno uniforme y definido. Células iguales en tamaño y forma rectangulares	Contorno desordenada e irregular Células desiguales en tamaño y forma.	Capa y contorno continua de células isodiamétricas, buliformes	Capa y contorno irregular Células colapsadas, muy alargadas, afiladas	Contorno bien delimitado, y uniforme. Células, alargadas. Bordes aserrados.	Capa irregular y ondulada. Células semicirculares, tamaños diferentes.
<b>EPIDERMIS ABAXIAL</b>	Capa continua y bien definida. Células isodiamétricas y regulares entre sí. Tricomas presentes.	Capa desordenada Células alargadas, tamaño similar al adaxial. Ausencia de tricomas.	Capa y contorno continua de células isodiamétricas, buliformes	Capa y contorno irregular Células colapsadas, muy alargadas, afiladas	Capa Bien definida Células redondeadas, Isodiamétricas Bordes aserrados	Capa irregular, plegada. Células alargadas No sobresale el borde aserrado.
<b>CUTÍCULA</b>	Adaxial: 0.50µm Abaxial: 0.37 µm Relación 1:0.7	Adaxial: 0.30µm Abaxial: 0.25 µm Relación 1:0.8	Adaxial: 0.43µm Abaxial: 0.30 µm Relación 1:0.7	Adaxial: 0.20µm Abaxial: 0.13 µm Relación 1:0.6	Adaxial: 0.96µm Abaxial: 0.88 µm Relación 1:0.9	Adaxial: 0.26µm Abaxial: 0.26 µm Relación 1:1
<b>ESTOMAS</b>	Apariencia normal, diferenciados de la epidermis Cámara subestomática dentro del parénquima esponjoso.	Células acompañantes deformes, acortadas Cámara subestomática ocupa todo el espacio del p. esponjoso.	Células acompañantes bien definidas Cámara subestomática puede llegar hasta la mitad del mesófilo	Células acompañantes colapsadas, sin diferenciación de la epidermis. La cámara subestomática abarca todo el mesófilo.	Células acompañantes alargada. Estomas ligeramente hundidos.	Células acompañantes triangulares. Estomas al nivel de la epidermis.
<b>PARÉNQUIMA EN EMPALIZADA</b>	Células alargadas, regulares en forma y tamaño; muy unidas entre sí.	Células ensanchadas e irregulares No se encuentran unidas.	No existe	No existe	No existe	No existe

**Cuadro 6. Diferencias anatómicas entre plantas de *Vitis vinifera* L., *Sorghum bicolor* (L) Moench y *Agave tequilana* Weber cv. Azul obtenidas in vivo y multiplicadas in vitro. Continuación.**

PLANTA  CARACTERÍSTICAS	<i>Vitis vinifera</i> L		<i>Sorghum bicolor</i> (L) Moench.		<i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul	
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
<b>PARÉNQUIMA ESPONJOSO</b>	4 estratos de células isodiamétricas, homogéneo, con algunos espacios intercelulares	2 estratos de células amorfas, heterogéneo, con grandes espacios intercelulares.	3 estratos de células isodiamétricas, con algunos espacios intercelulares	2 estratos de células alargadas, con numerosos espacios intercelulares	12 estratos Células lagunares, gran tamaño.	16 estratos Células. Amorfas, tamaños variables
<b>VENAS PRINCIPALES</b>	Vaina del haz bien definida. 13 vasos de xilema, 108 tubos cribosos isodiamétricos. Colénquima isodiamétrico, muy unido	Vaina del haz irregular. 5 vasos de xilema, 6 tubos cribosos colapsados. Colénquima alargado e irregular.	Vaina del haz bien definida. 2 células metaxilemáticas redondas, 17 vasos de xilema isodiamétricos + 1 espacio interxilemático 28 tubos cribosos Esclerénquima abaxial uniforme y redondo.	Vaina del haz forma variable. 3 células metaxilemáticas ovaladas, 10 vasos amorfos de xilema 13 tubos cribosos redondeados Esclerénquima abaxial desorganizado y amorfo.	4 células metaxilemáticas redondeadas, 6 protoxilemáticas cuboidales y 24 tubos cribosos.	3 células metaxilemáticas redondeadas, 3 protoxilemáticas cuboidales y 15 tubos cribosos
<b>VENAS SECUNDARIAS</b>	Vaina del haz bien definida. 5 vasos xilema redondos 46 tubos cribosos redondos, isodiamétricas. Colénquima isodiamétrico.	Vaina del haz irregular . 3 vasos xilema ovalados 108 tubos cribosos. Colénquima amorfo.	2 células metaxilemáticas redondas, 5 protoxilemáticas cuboidales + 1 espacio interxilemático y 15 tubos cribosos ovalados	3 células xilemáticas + 1 espacio interxilemático y 22 tubos cribosos ovalados	3 vasos de metaxilema, 10 protoxilemáticas; 22 tubos cribosos	2 vasos de metaxilema, 3 protoxilemáticas; 22 tubos cribosos
<b>VENAS TERCIARIAS</b>	3 células de protoxilema 12 células floemáticas	1 sola célula protoxilemática y una sola floemática.	Células buliformes en la vaina del haz, 2 vasos de xilema; 8 tubos cribosos	Células buliformes en la vaina del haz, 2 vasos de xilema; 8 tubos cribosos	3 células de metaxilema, 3 protoxilemáticas; 13 protofloema.	2 células de metaxilema, 2 protoxilemáticas; 10 protofloema.

### **5.3. Diferencias anatómicas in vitro entre plantas C-3, C-4 y MAC**

Al igual que sus homólogas *in vivo*, las plantas obtenidas *in vitro*, C-3, C-4 y MAC comparten las mismas características anatómicas en las hojas, sin embargo, resultaron notoriamente modificadas en su morfología y estructura celular, así como la reducción en el grosor de la cutícula tanto abaxial como adaxial, como resultado de la interacción ambiental con el genotipo estudiado en ambas condiciones. Como lo señala Barrera (2004), en las primeras etapas de la fase de aclimatación, las plantas presentan la pérdida de algunas de las hojas formadas *in vitro*, las persistentes continúan teniendo un patrón de crecimiento normal.

Antes de diferenciar las estructuras anatómicas de las plantas C-3, C-4 y MAC, resulta primordial iniciar el análisis a partir de las características que comparten en común. En primer término, en todos los casos, se manifiesta una sola capa de células, tanto en el haz como en el envés, modificadas en todos los casos en su forma y tamaño, las cuales, constituyen el tejido epidérmico. Se encuentran protegidas, por una capa de cera epicuticular que cubre a estas células, pero disminuida en su grosor que varió entre el 40 y el 70% en comparación con las plantas desarrolladas en condiciones *in vivo*.

En lo referente a los estomas, se apreciaron mayoritariamente abiertos en las hojas de las plantas multiplicadas *in vitro*; sin embargo, en lo referente a su anatomía, se vieron modificadas tanto en la forma como en el tamaño las células acompañantes.

Otra similitud observada en el tejido vascular, es la existencia de venas principales, secundarias y terciarias. Anatómicamente, se observa el xilema formado por células de mayor tamaño dentro del haz vascular, ocupando casi el 50% del mismo y ubicadas hacia el lado adaxial de la hoja, con pocas células con relación al floema y visiblemente engrosadas en su pared. Ubicadas hacia el envés, se aprecia el conjunto de células floemáticas, en mayor número pero de menor tamaño con respecto al xilema, estrechas y unidas entre si.

Ahora bien, las diferencias observadas en el mismo sistema vascular, dan pauta de partida para la diferenciación anatómica. En el caso de las plantas C-3, se observa claramente una vena central, perfectamente definida, diferenciada del resto por su gran tamaño con respecto a la hoja, lo cual se encuentra estrechamente relacionado con la existencia de nervadura reticulada, donde visiblemente se encuentra marcada la diferencia entre la vena principal, secundarias y terciarias por su posicionamiento en la hojas y no por su tamaño.

En las plantas C-4, la vena central se encuentra perfectamente diferenciada del resto por su ubicación a la mitad de la hoja, -visto de forma transversal- el tamaño visiblemente mayor y por la presencia de un grupo de células esclerenquimáticas en el envés, que dan muestra del soporte y protección que otorgan éstas al haz vascular. Las venas secundarias se encuentran equidistantes entre si, e intermedias entre éstas se aprecias las venas terciarias, presentando un desarrollo y especialización anatómicos menores, así como una reducción de células de esclerénquima en el resto de las nervaduras.

Por su parte, las plantas MAC no muestran diferencias significativas en su sistema vascular mas, aunque si se distingue por un tamaño relativamente mayor la vena central del mesófilo

observado transversalmente, y por la evidente reducción en el número de células que conforman el haz conforme va decreciendo su importancia en la hoja.

Igualmente, el tejido fundamental proporciona una clave fundamental para la diferenciación de plantas C-3, C-4 y MAC. En el caso de las C-3, resulta evidente la diferenciación del parénquima en empalizada y del esponjoso, siendo en ambos casos modificados anatómicamente en su estructura celular en forma y tamaño, pero en una proporción del 50% del espacio ocupado por el mesófilo para cada uno. Para las plantas C-4, no existe tal diferencia, pues se trata de una vena simétrica con respecto al mesófilo, propiedad que le da la facultad de ser más eficiente en su aparato fotosintético. Por su parte, aunque teóricamente las plantas MAC no debieran presentar diferencia en su mesófilo, en este estudio se apreció afectado en su apariencia el mesófilo de las hojas de plantas multiplicadas *in vitro*, sin embargo, este resultado puede ser atribuible a la técnica de corte.

De esta forma, y de manera muy similar a sus semejantes *in vivo*, las plantas multiplicadas *in vitro* presentan las mismas diferencias anatómicas, producto de su especialización, evolución y adaptación a sus respectivos ambientes de desarrollo.

En el cuadro 7, se resumen las diferencias anatómicas más importantes de las plantas de metabolismo C-3, C-4 y MAC multiplicadas *in vitro*, representadas con las especies analizadas en este estudio.

**Cuadro 7. Características anatómicas de plantas con metabolismo C-3, C-4 y MAC multiplicadas *in vitro*.**

METABOLISMO CARACTERÍSTICA	C – 3	C – 4	MAC
TEJIDO EPIDÉRMICO	Células epidérmicas irregulares. Estomas de apariencia triangular, heterogéneos. Ausencia de tricomas	Células epidérmicas irregulares, colapsadas. Células estomáticas deformadas, poco diferenciados de las células epidérmicas.	Apariencia irregular del borde. Células epidérmicas irregulares Estomas de apariencia triangular.
TEJIDO FUNDAMENTAL	Parénquima en empalizada visiblemente modificado, separado entre sí, pero con mayor concentración de cloroplastos. Parénquima esponjoso amorfo. Amplios espacios en el parénquima.	Hojas equifaciadas. Solo existe parénquima esponjoso. Mesófilo colapsado. Incremento del espacio celular.	Hojas equifaciadas. Parénquima acuífero. Mesófilo colapsado.
TEJIDO VASCULAR	Vena central perfectamente definida. Nervadura reticulada	Presencia de la vaina del haz Vena central compleja Paralelinerve	Paralelinerve.

#### **5.4. Aplicaciones Agrobiotecnológicas**

Las aplicaciones agrobiotecnológicas factibles de ser desarrolladas en el mercado, se concentrarán la agricultura protegida, en la cual se requiere de una serie de insumos diferentes a los tradicionalmente utilizados.

Una investigación adicional, debe ser enfocada en encontrar los espectros de luz adecuados para cada especie durante la fase *in vitro*, de forma tal que las modificaciones a nivel celular se vean minimizadas y que permitan a la planta, una vez que sea transplantada, reducir el estrés ocasionado por el cambio de ambiente, al cual debe adaptarse y modificar las características anatómicas que se observaron entre las plantas *in vitro* y las *ex vitro* de tal forma, se puede reducir la fase de aclimatación y permitir que el material vegetativo sea incorporado más rápidamente a un sistema de producción comercial.

En este sentido, una aplicación inmediata de los resultados obtenidos de trabajos experimentales como el anteriormente expuesto, es el uso de mallas de sombreo con diferentes rangos de absorción de luz, de tal forma que las plantas obtenidas *in vitro* sufran un estrés reducido en la fase de aclimatación en el vivero o directamente en el invernadero, de tal forma que el incremento de radiación solar sea gradual, mientras la planta utiliza las reservas acumuladas y las hojas *in vitro* sirven como soporte fotosintético con un mínimo estrés mientras se generan nuevas hojas, aclimatadas a condiciones mas cercanas a las condiciones ambientales predominantes.

Del mismo modo, se debe investigar en las necesidades de humedad relativa óptima que reduzcan la pérdida de agua por transpiración estomática, al pasar de un ambiente con una humedad relativa del 100%, a su vez que las células estomáticas se aclimaten y comiencen a cerrar cuando esta humedad se sea reducida. En este sentido, la investigación debe enfocarse al lapso de tiempo que el ambiente en el vivero o en el invernadero debe ser humidificado por medio de nebulizadores, los cuales produzcan el efecto de una neblina, incrementando la humedad relativa ambiental y a su vez, los lapsos de tiempo adecuados

que permitan ir reduciéndola de manera gradual, hasta llegar a las condiciones ambientales normales.

En este mismo sentido, se deben realizar las pruebas necesarias que arrojen como resultado la calibración de los equipos de calefacción con la finalidad de determinar los saltos térmicos permisibles que la planta pueda soportar, para por un lado iniciar su actividad metabólica normal y por el otro reducir el estrés provocado por el cambio ambiental bajo el cual se encontraba en condiciones *in vitro*.

Igualmente, se deben desarrollar las tecnologías de riego por goteo adecuadas que permitan suministrar a la planta, ya en condiciones *in vivo*, una lámina de riego óptima sin que esta resulte en exceso ni sea demasiado baja como para no suplir las necesidades hídricas, las cuales serán durante la primera fase de aclimatación elevadas.

Una aplicación adicional, será la implementación de acolchados y coberturas de suelo que reduzcan la pérdida de humedad del suelo, favoreciendo que la zona radical tenga el agua disponible sin mayor limitación que el drenaje mínimo requerido para el lavado de sales. A su vez, la combinación adecuada del color de los plásticos, tanto en la parte reflejante como en la oscura, serán auxiliares para generar mejores condiciones microambientales para la planta en aclimatación, y al mismo tiempo, que reduzcan la presencia de plagas en las plantas recién transplantadas al vivero o al invernadero.

Otro enfoque de aplicación, se puede ver enfocado en la investigación de mezclas de sustratos ideales, capaces de ofrecer las condiciones ideales para que el sistema radical

pueda comenzar a aclimatarse y transformarse gradualmente en un sistema activo para la absorción de agua y nutrimentos.

El desarrollo de fertilizantes altamente asimilables para la planta será otra pauta de investigación, de tal suerte que la planta no se vea afectadas por deficiencias de algún nutrimento que no pueda ser absorbido por el sistema radical, el cual igualmente debe sufrir una fase de aclimatación hasta generar el desarrollo de raíces capaces de absorber los nutrimentos del sustrato bajo condiciones *in vivo*.

La combinación de estas aplicaciones agrobiotecnológicas, deben ser el resultado de una ardua experimentación, llevada a cabo bajo condiciones ambientales ideales y controladas, para que posteriormente puedan ser extrapoladas a los diferentes condiciones ambientales de las zonas de producción; a su vez, se debe estudiar cada especie de interés económico de manera particular hasta lograr el desarrollo de un paquete tecnológico explícito, accesible, viable y de fácil ejecución para el productor de alimentos bajo el concepto de la agricultura protegida.

# CONCLUSIONES

- ♣ Las vitroplantas de *V. vinifera* L., *S. bicolor* (L) Moench. y de *A. tequilana* Weber cv. Azul, manifiestan a la interacción del genotipo con el ambiente sobre el cual se desarrollaron, lo cual generó notorias diferencias anatómicas en las estructuras celulares de sus hojas.
  
- ♣ En todas las especies, los explantes multiplicados *in vitro*, en comparación con los obtenidos *in vivo*, muestran diferencias morfológicas en cuanto a la postura de las hojas, en las formas de los ápices y en su dirección con respecto al tallo.
  
- ♣ En todas las especies, en las hojas de las plantas multiplicadas *in vitro* se presenta una reducción en el grosor de cutícula, alteración en el ordenamiento y forma de las células, que conforman los tejidos: epidérmico, fundamental y vascular, en todas las hojas de los explantes estudiados.
  
- ♣ En todas las especies, en promedio se manifestó una reducción en 52 % en el grosor de la cutícula adaxial y en 55 % el grosor de la cutícula abaxial, en comparación con las plantas obtenidas *in vivo* vs las plantas multiplicadas *in vitro*.
  
- ♣ Los explantes obtenidos *in vitro* de *V. vinifera* L., se diferencian morfológicamente de las plántulas obtenidas bajo condiciones *in vivo*, en la ausencia de pubescencias y tricomas en el envés de la hoja. Asimismo, *in vitro* se desarrollaron únicamente tres lóbulos mientras que en la condición *in vivo* fue de cinco.

- ♣ Los explantes obtenidos *in vitro* de *S. bicolor* (L) Moench, contrastan morfológicamente de los obtenidos *in vivo* en cuanto a la ausencia de pubescencias en el envés.
  
- ♣ Se presentaron diferencias en la reducción de la intensidad del color tanto del haz como del envés en los explantes obtenidos *in vitro* de *V. vinifera* L. así como en los de *A. tequilana* Weber cv. Azul, con relación a las plantas obtenidas *in vivo*.
  
- ♣ En todas las especies, los explantes multiplicados *in vitro* varía con sus homólogos *in vivo* en cuanto a la ausencia de pelos absorbentes en la raíz.
  
- ♣ El conocimiento generado por las modificaciones anatómicas de las plantas multiplicadas *in vitro*, pueden permitir el desarrollo de agrotecnologías biológicas aplicadas a diferentes sistema de producción, considerando las diferencias entre las plantas C-3, C-4 y MAC.

**LITERATURA**

**CITADA**

- Bálsamo, R., A. Bauer, S. Davis y B. Rice. 2003. *Leaf biomechanics, morphology and anatomy of the deciduous mesophyte Prunus serrulata (Roseaceae) and the evergreen sclerophyllus shrub Heteromeles arbutifolia (Rosaceae)*. American Journal of Botany, 90:1:72-77.
- Barrera, MA. 2004. *Aclimatación de plantas obtenidas in vitros de Agave tequilana Weber cv. Azul*. Tesis de Licenciatura (Ingeniería Agrícola). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, México, pp 44.
- Benson, E. 1999. *Plant conservation biotechnology*, Taylor&Franus, United Kingdom, pp 50-51.
- Bidwell, RGS. 1979. *Fisiología vegetal*. AGT Editor. México. 784 p.
- Blomberg, L. 2000. *Tequila, mezcal y pulque*. Diana, México, pp 101-105.
- Borkwska, B. 2001. *Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted in vitro or in vivo*. Scientia Horticulturae, 89:195-206.
- Bosch, P. 2002. *Importancia de la biotecnología para la economía mexicana.*. En Bolivar, F. (Coord). 2002. *Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - Fondo de Cultura Económica. México, pp 25-42.
- Bukovac, MJ. 1997. *The plant surface: a defining factor in performance of plant bioregulators*. Acta Hort. 463:23-29.
- Capellades, M, R. Fontamu, C. Carulla and P. Debergh. 1990. *Environment influences anatomy of stomata and epidermal cells in tissue cultured Rosa multiflora*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115:141-145.
- Chauvet, M y A. Reigner. 1984. *Manual de vitivinicultura*, 3ª edición, Mundi Prensa, Madrid, pp 43-64.
- Claridades Agropecuarias. 2000. *El agave tequilero: pencas que abrazan al mundo*. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural – Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria, México, 87:1-41.
- Cozza, R., D. Turco, C. Briccoli and B. Bitonti. 1997. *Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of Olea europea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 51:215-223.
- Cronquist, A. 2000. *Introducción a la botánica*. Continental, México, pp 481-488.
- Cruz-Pizarro, F. 2000. *Niveles de sacarosa y relación  $NO_3^-:NH_4^+$  en el cultivo in vitro de brotes de vid (Vitis vinifera) “Málaga Roja”*. Tesis de Maestría, Colegio de Postgraduados, México, 78 p.

- Debergh, P.C. 1991. *Acclimatization techniques of plants from in vitro*. Acta Hort. 289: 291-300.
- Dennis, P.S. 1986. *Commercial micropropagation of florist flower crops*. In Zimmerman, R.H. *et al. Tissue culture as a plant production system for horticultural crops*. Martinus Nijhoff Publishers. Netherlands, pp 301-317.
- Dickinson, W. 2000. *Integrative plant anatomy*. Academic Press, USA, 533 p.
- Dimasi, K. y A. Bosabalids. 1997. *Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, starch and total sugar accumulation, and rate of photosynthesis in Actinidia deliciosa cultured in vitro*. Acta Hort. 444 (1): 139-144.
- Esau, K. 1982. *Anatomía de las plantas con semilla*. Hemisferio Sur, Argentina, 512 p.
- Esau, K. 1985. *Anatomía vegetal*. 3ª edición, Omega. México, 779 p.
- Fabbri, A. 1986. *Anatomical changes in persistent leaves of issue cultured strawberry plants after removal from culture*. Scientia Hort. 28:331-337.
- Flores-Vindas, E. 1999. *La planta, estructura y función*. LUR, Costa Rica, pp 496-722.
- Freeman, J. 1975. *Desarrollo y estructura de la planta de sorgo y su fruto*, en Wall, J. y W. Ross. (Comp). 1975. *Producción y usos del sorgo*, Centro Regional de Ayuda Técnica – Hemisferio Sur, Argentina. pp 19-25.
- Freeman, B., G. Albrigo and R.H. Biggs. 1979. *Cuticular waxes of developing leaves end fruit of blueberry, Vaccinium ashei reade cv. Bluegem* J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104:398-403.
- Fuentes-Yague, J.L. 1998. *Botánica agrícola*. 5ª edición, Mundi Prensa, Barcelona, pp 49.
- Galleta, G. y D. Himelrick. 1990. *Small fruit crop management*. Prentice Hall. USA. pp 401-408.
- Gentry, H.S. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson, USA, pp 382-586.
- Gobierno del Estado de Hidalgo – Museo Nacional de Culturas Populares. 1988. *El maguey, árbol de las maravillas*. Secretaría de Educación Pública – Instituto Nacional Indigenista – Dirección General de Culturas Populares, México, pp 21.
- González. E. 2001. *Micropropagación de Mammillaria spp.* Tesis de Licenciatura (Ingeniería Agrícola). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, México, 68 p.
- González, L. 1987. *Monografía del sorgo*. Universidad Nacional Autónoma de México. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Aragón. pp 5-6.

- Gould, F.W. y R.B. Shaw. 1992. *Gramíneas*, AGT Editor, México, pp 240.
- Granados, D. 1993. *Los agaves en México*, Universidad Autónoma Chapingo, México, pp 99-114.
- Guerrero, A. 1992. *Cultivos herbáceos extensivos*. 5ª edición, Mundi Prensa, España, pp 224-225.
- Guerrero, R. 2000. *Aclimatación de Lilium longiflorum con diferente relación nutrimental*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, México. 68 p.
- Hidalgo, L. 1985. *Poda de la vid*. 3ª edición, Mundi Prensa, Madrid, 15-50 pp.
- Herrera, L., A. Larqué y A. Serratos. 2002. *La biotecnología en el sector agrícola*. En Bolívar, F. (Coord). 2002. *Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Fondo de Cultura Económica. México, pp 145-167.
- Heywood. 1985. *Las plantas con flores*. Reverté. Barcelona, pp 16.
- Hughes, H.D., M Heat y D. Metcalfe. 1976. *Forrajes*. Continental, México, pp 383-385.
- Huguette, S., M Tort and A. Coudret. 1993. *The ultrastructure of micropropagated and greenhouse rose plant stomata*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32:227-233.
- Ibar, L. 1984. *El sorgo, cultivo y aprovechamiento*. Aedos, Barcelona, pp 9-16.
- Kim, K. and A. De Hertogh, 1997. *Tissue culture of ornamental flowering bulbs (Geophytes)*. Horticultural Reviews 18:87-169.
- Kirdmance, C., Y. Kitaya y T. Kozai. 1995. *Effects of CO<sub>2</sub> enrichment and supporting material in vitro on photoautotrophic growth of Eucalyptus camandulensis plantlets in vitro and in vivo: anatomical comparisons*. Acta Hort. 393: 111-118.
- Lebgue, T. y A. Valero. 1986. *Manual para identificar las gramíneas de Chihuahua*. Gobierno del Estado de Chihuahua, México, pp 191-192.
- López, L. 1991. *Cultivos herbáceos Vol. I: Cereales*. Mundi Prensa, España, pp 397-406.
- Loyola, E. 1956. *La industria del pulque*. Banco de México, México, pp 1.
- Mack, T. 2009. *México y la agricultura en 2020*. 2000 Agro. 55:72-75.
- Marro, M 1989. *Principios de vitivinicultura*. CEAC, Barcelona, pp 24-57.
- Martín, J. 1975. *Historia y clasificación de los sorgos (Sorghum bicolor (Linn.) Moench)*. En Wall, J. y W. Ross. (Comp). 1975. *Producción y usos del sorgo*, Centro Regional de Ayuda Técnica – Hemisferio Sur, Argentina. pp 1-17.

- Martínez, M. 1994. *Catálogo de nombres comunes y científicos de plantas mexicanas*. Fondo de Cultura Económica, México, 558 p.
- Massai, P., B. Dichio y V. Nuzo. 1997. *Morphological and anatomical modifications induced by in vitro propagation of kiwifruit plants*. Acta Hort, 444. Vol. I. pp 127-132.
- Mauseth, J. 2003. *Botany*. Jones and Bartlett Publishers. USA. pp 301-311.
- Metcalf, D. y D. Elkins. 1987. *Predicción de cosechas. Fundamentos y prácticas*. Limusa. México, pp 478-479.
- Misuguchi, S., M Ohkawa and T. Ohshiro. 1998. Hort Sci. 67(2)236-242.
- Mogollón, N., C. Ascano y E. Rojas. 2003. *Cambios fisiológicos durante la aclimatación de plantas in vitro de Dieffenbachia maculata Schott "Sublime"*. En Almaguer, V.G. (eds). *Memoria de resúmenes del X Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas, IX Congreso Nacional y II Internacional de la Asociación Mexicana de Horticultura Ornamental*. Chapingo, México. 182 p.
- Motts, I.E. 1932. *Botánica*. 3ª edición, Patricio Sanz, México, pp 260-261.
- Paniagua, S., M Nistal, P. Sesma, M Álvarez-Uría y B. Fraile. 1996. *Citología e histología vegetal y animal*, Mc Graw-Hill, España, pp 729-742.
- Paparozi, E.T. and H.B. Tukey. 1979. *Foliar uptake of nutrients by selected ornamental plants*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104:843-846.
- Pierik, R.L.M 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*, Mundi-Prensa, España, 362 p.
- Poehlman, J.M y D. Allen. 2003. *Mejoramiento genético de las cosechas*, 2ª edición, Limusa, México, pp 364-365.
- Preece, J.E. and E.G. Sutter. 1991. *Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field*, IN P.C. Debergh and R.H. Zimmerman (eds), *Micropropagation*. Kluwer academic publisher. Netherlands, pp 71-93.
- Ramos, MG. y P. Zavaleta. 1993. *Síntesis botánica*. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, México, pp 35-40.
- Ramos, R. 2001. *Técnicas de investigación en biología molecular*. Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, pp 97-98.
- Read, P.E. and C.D. Fellman. 1985. *Accelerating acclimation of in vitro propagated woody ornamentals*. Acta Hort. 166:15-20.
- Robles, R. 1994. *Producción de granos y forrajes*. 5ª edición, Limusa, México, pp 153-157.

- Rodríguez Suppo, F. 1982. *Riego por goteo*. AGT Editor, México, pp 34-38.
- Ruiz Oronoz, M 1979. *Tratado elemental de botánica*. 15ª edición, ECLALSA, México, pp 186-189.
- Salisbury, F. y C. Ross, 1994. *Fisiología vegetal*, Iberoamérica, México, 758 p.
- Santamarina, M.P., F. García, J. Rosellú y V. Vilella. 1997. *Biología y botánica Tomo I*. Universidad Politécnica de Valencia, España, pp 230-244.
- Sass, J.E. 1968. *Botanical microtechnique*. The Lows State University Press. USA. 227 p.
- Shawkym, M, A. Rawash y M Salama. 1997. *Histological studies on banaty and red romi grapevine transplants as affected by different irrigation treatments*. Acta Hort, 441:257-261.
- Stern, K. 1994. *Plant biology*. Brown Publishers, USA, pp 87-104; 144-152.
- Strasburger, E., F. Noll., H. Schenk y A. Schimper. 1991. *Tratado de botánica*. 8ª edición. Omega, España, pp 215-228; 261-300.
- Sutter, E. 1985. *Morphological, physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated in vitro*. Annals of Botany. pp 55, 321– 329.
- Sutter, E. and R.W. Langhans. 1979. *Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104:4:493-496.
- Tico, L. 1978. *Cómo ganar dinero con el cultivo de la vid*. 3ª edición, Sartebi, Barcelona., pp 9-17.
- Valenzuela, A. G. 1997. *El agave tequilero, su cultivo e industria*. Monsanto – Litters, México, pp 31-53.
- Vázquez, V. S. 1994. *Cambios morfológicos, anatómicos y fisiológicos en plantas aclimatadas de anturio y orquídeas*. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, México, 77 p.
- Viniegra-González, G. 2005. *Biotecnología, prioridades para el desarrollo*. Ciencia y Desarrollo. México, pp 181: 36-41.
- Wilson, C. y W. Loomis. 1980. *Botánica*. UTEHA, México, pp 92-98.
- Winkler, A. J. 1981. *Vitivinicultura*. Continental, México, pp 103-203.

# **ANEXOS**

## **Anexo 1**

Para la preparación del medio de cultivo Cruz-Pizarro (2000), se determinó la cantidad necesaria de cada nutrimento, fueron pesadas por separada cada una de las fuentes en una balanza granataria o analítica, según fuera el caso, en el orden indicado en el Anexo 2. Con ayuda de un agitador magnético, se colocó agua destilada en un vaso de precipitado de 50 mL y se adicionó el nutrimento indicado hasta su completa disolución; en seguida, se adicionaban las soluciones obtenidas en un vaso de precipitado de 1 litro de capacidad. En el caso de los compuestos vitamínicos y hormonales, el solvente empleado fue alcohol. Se tomó la alícuota correspondiente para la preparación de 1 litro de solución. Para el agar, fue pesado en una balanza granataria y disuelto por separado en agua destilada y posteriormente sometido a microondas con el fin de facilitar su disolución en la solución final. Cuando estuvieron disueltos todos los componentes del medio de cultivo, se aforó a un litro con agua destilada.

Una vez estériles los tubos y con el medio recién preparado, con ayuda de una jeringa de flujo continuo, se colocaron 10 mL en cada tubo de ensaye, inmediatamente fue tapado y nuevamente sometido a un proceso de esterilización a 15 PSI durante 30 min.

## Anexo 2

### Composición del medio de cultivo Cruz-Pizarro (2000).

No	ELEMENTO	COMPUESTO	mEq•L <sup>-1</sup> *
1	Nitrógeno	NH <sub>4</sub> <sup>+1</sup>	220
2		NO <sub>3</sub> <sup>-1</sup>	482
3	Calcio	Ca <sup>+2</sup>	40
4	Fósforo	PO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	35
5	Magnesio	Mg <sup>+2</sup>	60
6	Azufre	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	60
7	Potasio	K <sup>+1</sup>	35
8	Fierro	Fe <sup>+2</sup>	3
9	Sodio	Na EDTA	0.7 g
10	Manganeso	Mn	0.01
11	Sodio	Na <sup>+1</sup>	0.02
12	Boro	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.01
13	Molibdeno	MoO <sub>4</sub>	0.01
14	Cobre	Cu <sup>+2</sup>	0.06
15	Azufre	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	0.03
16	Cloro	Cl <sub>2</sub> <sup>-1</sup>	0.07
17		Mioinositol	1.0
18	Vitaminas	Tiamina	0.1
19	Hormonas	Piridoxina	0.1
20		Ácido nicotínico	0.1
21		Citocininas (BA)	0.5
22		AIB	0.1
23		Agar	6 g
24	Carbohidratos	Sacarosa	30 g

\* Excepto donde se indique  
Fuente: Cruz-Pizarro (2000).