

MICROPROPAGACIÓN DE *Agave durangensis* GENTRY EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT)

Jiménez Hidalgo, Antonio de Jesús (1), Núñez Palenius, Héctor Gordon (2)

1 [Ingeniería en Agronomía en el Instituto Tecnológico de la Zona Olmeca] | [g-mlo_10@hotmail.com]

2 [División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato –Salamanca, Universidad de Guanajuato] | [palenius@ugto.mx]

Resumen

Las especies del género *Agave* han sido importantes para los pobladores de México ya que son productoras de alimento, de fibras naturales, de materia prima para elaborar bebidas alcohólicas y de materiales para la construcción, y por su importancia reciente como plantas ornamentales. El *Agave durangensis* Gentry, comúnmente llamado maguey cenizo, es una especie endémica de México que es utilizado como planta ornamental y para la elaboración de pulque y mezcal de forma artesanal. Por la gran importancia que tiene se planteó realizar un sistema de inmersión temporal utilizando un ciclo de inmersión de 1 minuto cada 72 horas para determinar cuáles son las mejores concentraciones de los reguladores de crecimiento Cinetina y Ácido Indol-3-butírico (IBA) para la micropropagación *in vitro* de *A. durangensis* Gentry, y de esta manera multiplicar y conservar la especie. El mejor tratamiento para la producción de primordios de brotes de *novo* y raíces en explantes, fue el que tuvo un balance de reguladores correspondiente a 25 mg/L de Cinetina y 1 mg/L de IBA, que generaron un promedio de 5.33 brotes de *novo* y 2.33 raíces nuevas por explante.

Abstract

The species of the genus *Agave* have been important for the inhabitants of Mexico, since these plants are producers of food, natural fibers, raw material to make alcoholic beverages and materials for the construction, and for its recent importance as ornamental plants. The *Agave durangensis* Gentry, commonly called maguey ash, is an endemic species of Mexico that is used as an ornamental plant and to produce pulque and mezcal handmade. Because of its foremost importance, a temporary immersion system was designed, using a 1-minute immersion cycle every 72 hours to determine the best concentrations of the growth regulators Kinetin and Indole-3-butyric acid (IBA), for the *in vitro* micropropagation of *A. durangensis* Gentry and in this way multiply and preserve the species. The experiment depicted that the best treatment to produce primordia of *de novo* shoots and root in explants, was that with a balance corresponding to 25 mg/L of Kinetin and 1 mg/L of IBA that generated an average of 5.33 *de novo* shoots and 2.33 new roots per explant.

Palabras Clave

Agave durangensis Gentry; Sistema de inmersión temporal; Cinetina; Acido Indol-3-butírico.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

El nombre de *Agave* proviene del griego *agavos*, que significa noble, admirable, el cual fue utilizado por Linneo en 1753 en el documento *Species Plantarum* como consecuencia de las características de las plantas, después de producir una inflorescencia, su único evento reproductivo en su vida, que puede ser muy grande y espectacular, prosigue su muerte, pero por otro lado, se suman las propiedades y/o virtudes de la planta y su aprovechamiento [1].

- *Agave durangensis* Gentry

El *Agave durangensis*, también conocido como maguey cenizo, pertenece al género *Agave* y puede reproducirse por semilla, bulbillo o menos eficientemente por rizomas. Su crecimiento es muy lento y la maduración toma de 8 a 10 años y florece solo una vez emitiendo un tallo largo de 10 metros de altura aproximadamente, que nace en el centro de una roseta formada por sus hojas gruesas y carnosas. La planta puede alcanzar los dos metros de diámetro, tiene hojas verdes azuladas con abundantes espinas en los márgenes de la hoja y una espina apical prominente; es originario de los estados de Durango y Zacatecas, en México, donde crece en suelos rocosos entre 1600 y 2600 msnm, y resiste sequías y heladas moderadas [2].

- *Micropropagación*

La micropropagación es el proceso que utiliza técnicas de cultivo *in vitro*, en las que se selecciona un explante, se desinfecta, se aísla en un recipiente estéril y, artificialmente, se le otorga condiciones para que sus células manifiesten su totipotencialidad; es decir, la capacidad de regenerar una planta completa a partir de una parte de la planta madre, que conserva todas sus características genéticas [3].

- *Sistema de inmersión temporal*

Son sistemas semi-automatizados en la propagación *in vitro*. Está basado en el contacto intermitente del medio de cultivo líquido con los explantes por un corto período de tiempo y la consecuente renovación de la atmósfera gaseosa, para evitar la hiperhidricidad de los tejidos y la acumulación de gases tóxicos [4].

Justificación

Debido a su lento crecimiento, su largo periodo de maduración que toma entre 8 y 10 años, la pérdida anual de su ambiente natural y la falta de técnicas de propagación eficientes, han ido reduciendo el número de ejemplares en la naturaleza de *A. durangensis* Gentry, por lo que desarrollar un método de micropropagación *in vitro* resulta fundamental para la multiplicación y conservación de la especie.

Hipótesis

Los explantes de *A. durangensis* Gentry se desarrollarán favorablemente con los reguladores de crecimiento vegetal Cinetina y Ácido Indol-3-butírico (IBA).

Objetivo

Determinar cuáles son las mejores concentraciones de Cinetina e IBA que induzcan un mayor número de brotes *de novo* y raíces para la micropropagación de *A. durangensis* Gentry.

Este estudio se efectuó en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales, de la División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato Salamanca de la Universidad de Guanajuato, Ex Hacienda El Copal, Km 9; carretera Irapuato-Silao C.P. 36500. Irapuato, Guanajuato, México.



Imagen 1: Agave durangensis accesión número 40 de la Colección Nacional de Agaves UG-SAGARPA

MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar el experimento se utilizaron los siguientes materiales:

- Frascos de vidrio con rejillas de plástico en el interior.
- Tapones de hule con tubos de silicón insertados en el centro rellenos de algodón.
- Pinzas
- Bisturí
- Medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962).
- Cinetina
- IBA (Ácido Indol 3-butírico)
- Cinta plástica
- Reguladores de pH

Diseño experimental

Se determinó llevar a cabo un experimento completamente aleatorio aplicando diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) Cinetina e IBA por lo que se probaron 12 tratamientos con diferentes balances.

	IBA	0.3 mg/L	0.5 mg/L	1 mg/L	3 mg/L
Cin					
15 mg/L		T1	T2	T3	T4

20 mg/L	T5	T6	T7	T8
25 mg/L	T9	T10	T11	T12

Tabla 1: Tratamientos con diferentes concentraciones de RCV.

Se realizaron 3 repeticiones de cada uno de los tratamientos por lo cual se utilizaron 36 frascos de vidrio de 413 ml y 36 tapones de hule, los cuales se etiquetaron según el tratamiento y el número de repetición para así poder llevar un control y hacer la toma de datos.

Medio de cultivo MS

Para la preparación del medio de cultivo Murashige and Skoog (1962) al 50%, se utilizó el medio MS M519 Phyto Technology Laboratories a una dosis de 4.4 g/L el cual proveerá los siguientes nutrientes esenciales para los explantes:

Macronutrientes	100 mg/L
MgSO ₄	50 mg/L
Fe EDTA	20 mg/L
Micronutrientes	1 mg/L
Vitaminas	1 mg/L

Y se le agregó adicionalmente una porción de 30 g/L de sacarosa y previo a la adición de los RCV se procedió a medir y regular el nivel de pH de la solución para que quedara en un rango de 5.7-5.8.

Ya agregados los reguladores al medio de cultivo MS líquido de acuerdo con cada tratamiento, se procedió a envasar 50 mL de la solución en cada frasco de vidrio. Posteriormente, los 36 frascos junto con los tapones de hule se colocaron en la autoclave para ser esterilizados a una temperatura de 121° C a una presión de 1.5 psi durante 20 minutos.



Imagen 2: Frascos de vidrio de 413 mL etiquetados y listos para esterilizar en la autoclave.

Obtención de los explantes

Los explantes de *A. durangensis* Gentry accesión número 40 fueron obtenidos de la Colección Nacional de Agaves UG-SAGARPA, Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Dado que la colección cuenta con cultivos *in vitro* se procedió a sacar los explantes del medio de cultivo MS al 50% sólido en un ambiente estéril dentro de la campana de flujo laminar, donde con pinzas y bisturí se hicieron los cortes necesarios para retirar las raíces y hojas necróticas, y así, obtener los 36 explantes necesarios para el experimento. En seguida se colocaron en frascos con medio de cultivo MS nuevo que fueron tapados y sellados con cinta plástica, para aguardar durante un día en la campana de flujo laminar.

Sistemas de inmersión temporal

Una vez que se tienen los explantes y los frascos esterilizados, todo es llevado a la campana de flujo laminar donde se lleva a cabo la siembra. Los explantes son sacados del medio de cultivo MS sólido y colocados cuidadosamente dentro de los frascos de vidrio con los RCV, luego, se colocan los tapones de hule en la boca de los frascos haciendo un pequeño empuje hacia abajo para que entre a presión para finalmente sellarlos con cinta plástica desde la parte inferior de la rosca de

la botella hasta unos 2 centímetros arriba del tapón sobre el tubo de silicón. Los frascos se llevaron al cuarto de crecimiento donde con la ayuda de un soporte de inclinación se dio la inmersión de los explantes durante 1 minuto cada 72 horas.



Imagen 3: Sistemas de inmersión temporal en el cuarto de crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El experimento se llevó a cabo en un lapso de 30 días en el que las variables a evaluar fueron la cantidad de primordios de brotes de *novo*, número de raíces, hojas nuevas y hojas necróticas que surgieron en los explantes.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes, de los 12 tratamientos experimentales probados, en el 75% se presentaron hojas nuevas en el que los mejores fueron los T10 (0.5 mgL de IBA y 25 mgL de Cinetina) y T12 (3 mgL de IBA y 25 mgL de Cinetina) con un promedio de una hoja nueva por explante. Por otra parte, el 66% de los tratamientos presentaron puntas necrosadas siendo el T9 (0.3 mgL de IBA y 25 mgL de Cinetina) el que origino más necrosis en contraste con los demás tratamientos.

El objetivo principal de esta investigación era averiguar cuál de los balances de RCV produciría un mayor número de brotes de *novo* y raíces nuevas, los resultados obtenidos muestran que el

66% de los tratamientos desarrollaron primordios de brotes *de novo* siendo el mejor el T11 (1 mgL de IBA y 25 mgL de Cinetina) con un promedio de 5.33 brotes por explante. En cuanto a raíces nuevas el 91% de los tratamientos las produjo, siendo nuevamente el T11 (1 mgL de IBA y 25 mgL de Cinetina) el más significativo en comparación con los demás tratamientos, teniendo un promedio de 2.33 raíces nuevas por explante.

Se realizó un análisis estadístico para determinar cuál era el mejor balance de RCV para la micropropagación de *A. durangensis* Gentry bajo un diseño experimental completamente al azar. El ANOVA ejecutado con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ establece que no existe una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, ya que los valores de p son mayores a los niveles probabilísticos establecidos (0.05 de significancia) como se muestra en la siguiente tabla.

Valores de p			
Hojas nuevas	Hojas necrosadas	Brotos de novo	Raíces
0.228	0.523	0.158	0.563

Tabla 2: Valores de p obtenidos del análisis de varianza

Sin embargo, al realizar una comparación de medias con el método DMS de Fisher con un nivel de confianza del 95% se puede observar como si existe una diferencia mínima entre los diferentes balances, tal y como se muestra en la tabla 3.

COMPARACIÓN DE MEDIAS CON EL MÉTODO DMS DE FISHER				
Tratamiento	Hojas nuevas	Hojas necrosadas	Brotos de novo	Raíces nuevas
1	0.67 AB	0.67 AB	1.33 B	0.67 AB
2	0.67 AB	0.33 AB	0.00 B	0.67 AB
3	0.33 AB	1.00 AB	0.67 B	0.33 B
4	0.00 B	0.00 B	1.00 B	0.00 B
5	0.67 AB	1.00 AB	0.00 B	1.33 AB
6	0.67 AB	0.33 AB	1.00 B	0.33 B
7	0.67 AB	0.67 AB	0.00 B	0.33 B
8	0.00 B	0.67 AB	0.00 B	0.67 AB
9	0.33 AB	1.33 A	0.33 B	1.00 AB
10	1.00 A	0.33 AB	1.33 B	0.67 AB
11	0.00 B	0.00 B	5.33 A	2.33 A
12	1.00 A	0.00 B	1.33 B	1.00 AB

Tabla 3: Concentrado de los resultados donde las medias que no comparten una misma letra poseen una diferencia mínima significativa.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento T11 con un balance de 1 mg/L de IBA y 25 mg/L de Cinetina teniendo un promedio de 2.33 raíces y 5.33 primordios de brotes *de novo* por explante es el más efectivo para la micropropagación de *A. durangensis* Gentry en un sistema de inmersión temporal en contraste con los otros tratamientos experimentales probados.



Imagen 4: Explante del T11R3 que desarrolló brotes y raíces.

Finalmente se acepta que la hipótesis planteada es correcta ya que el Ácido indol-3-butírico y la Cinetina si generan brotes *de novo* y raíces nuevas en el *Agave durangensis* Gentry puesto que solo 4 de los 12 tratamientos no generaron ningún brote y solo uno no generó raíces.

Este estudio servirá para desarrollar mejores técnicas de micropropagación que ayudarán a multiplicar y conservar al maguey cenizo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mi más profundo agradecimiento al Dr. Héctor Gordon Núñez Palenius. Responsable de la Colección Nacional de Agaves UG-SAGARPA, Lab. Cultivo de Tejidos, DiCiVa, Campus Irapuato-Salamanca. Por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

Agradezco a Rebeca Ramírez y Claudio Bernardo técnicos del laboratorio por toda la ayuda ofrecida durante mi estancia en el Verano Científico UG 2017.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Tabasco (CCYTET) por haberme hecho posible participar en este verano científico en el estado de Guanajuato.

REFERENCIAS

[1] García Mendoza, Abisai J. (2004) Agaves endémicos de México y algunos de sus destilados. Fecha de consulta 14 de Julio de 2017. Recuperado de: <http://mezecologia.mx/agaves-endemicos-de-mexico/>

[2] Park, S.N. 1998. Los incomparables agaves y cactus. México. Pp. 14-17. Ed. Trillas.

[3] Fundación para la innovación agraria (2009) Resultados y lecciones en sistema de inmersión temporal en especies anuales, frutales y vides. Pag: 6-7.

[4] Ecured (2017) Sistema de inmersión temporal. Fecha de consulta: 17 de Julio de 2017. Recuperado de: https://www.ecured.cu/Sistema_de_inmersi%C3%B3n_temporal