

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

Flores Solares Nancy Esmeralda (1), Muñoz Palenius Héctor Gordon (2)

1 [Ingeniería Agronómica en Sistemas de Producción Agrícola, Universidad de San Carlos de Guatemala] |
[nanciesflores@gmail.com]

2 [Ex Hacienda El Copal, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato- Salamanca, Universidad de Guanajuato] |
[palenius@ugto.mx]

Resumen

El *Agave durangensis* es una planta considerada endémica en México, en donde existen más de 150 especies de agaves que representan el 75% de la familia. El *Agave durangensis* es de gran importancia ya que representa una forma de sustento para la industria regional productora de mezcal. Debido a la sobre explotación de esta planta y a la necesidad de aumentar la producción es necesario encontrar alternativas que permitan una reproducción masiva de la misma. Una de estas opciones es la propagación *in vitro* la cual es una herramienta que se ha utilizado con mucho éxito en los últimos años. Esta investigación evaluó diferentes reguladores de crecimiento; IBA y Cinetina, a diferentes concentraciones en un Sistema de Inmersión Temporal. Se realizaron 12 tratamientos y 3 repeticiones con el objetivo de determinar el balance óptimo de los reguladores de crecimiento para generar el mayor número de primordios de brotes de *novo* en el menor tiempo posible de inmersión. En cuanto a la variable de número de primordios de brotes de *novo* se determinó que ningún tratamiento mostró diferencias significativas respecto al resto, según el análisis de ANDEVA. Aunque el tratamiento 12 compuesto por (3 mg/L IBA y 10 mg/L CIN) fue el que presentó la mayor media con 3.33.

Abstract

The *Agave durangensis* is consider endemic from México, and there are more than 150 Agave species that represent the 75 % of this entire family. *Agave durangensis* is of mayor value since is a big part of the nourishment for the local mezcal industry. Due to the over-exploitation, along with the necessity of improve the production, it's necessary to find new ways to increase the massive production of this plant. One of this options is the *in vitro* propagation, which is one of the most successful way of doing so in the latest years. This research evaluated different plant growth regulators such as IBA and Cinetina at different concentrations in a temporary immersion system. We run 12 treatments and 3 repeats on each one of them, aiming to determine the optimum balance of growth regulators that could generate the biggest *novo* bud outbreaks in the less time possible.

Palabras Clave

Cultivo de Tejidos; Sistema de Inmersión temporal; *in vitro*; Micropropagación.

INTRODUCCIÓN

Agave durangensis, conocido de otra forma como maguey cenizo, es una planta originaria del estado de Durango, México y de gran importancia económica para este país [1].

Esta especie puede alcanzar dos metros de diámetro, sus hojas son verdes azuladas y crece en suelos rocosos a altitudes de entre 1600 a 2600 msnm. En México existen más de 150 especies de Agaves que representan el 75% de las especies de la familia [2].

La mayoría de los Agaves se utilizan de manera empírica desde mucho tiempo atrás para bebidas alcohólicas como el mezcal, con un nivel de calidad y producción similar a la del tequila. Se aprovecha de tal manera que tiene una gran importancia económica para los habitantes de las comunidades rurales que viven en condiciones precarias [4].

Valenzuela *et al.* (2003) indican que en la mayoría de municipios de Durango, no se dan abasto con la reproducción de mezcal que demanda el mercado nacional e internacional, esto representa un grave problema no solo para la economía de la sociedad que es una fuente de ingresos sino también para la conservación de esta planta con el peligro a que desaparezca [3].

La protección de este recurso natural es de suma importancia no solo por representar grandes beneficios económicos para el país, sino también por ser una planta endémica de México. La necesidad de conservar este recurso filogenético ha propiciado que los investigadores desarrollen alternativas para su conservación entre las que destacan el uso de técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales; esta técnica tiene excelentes beneficios ya que permite un control preciso y fino del medio ambiente y también una mejor distribución de nutrimentos para la planta [9].

En esta investigación se utilizó el proceso de multiplicación, por medio de los sistemas de inmersión temporal (SIT), que son un grupo de sistemas semi-automatizados en la propagación *in vitro* que son muy eficientes porque permiten airear los tejidos de los brotes.

Esta investigación se realizó con el objetivo de establecer explantes *in vitro* de *Agave durangensis* en un sistema de inmersión temporal (SIT) y determinar las concentraciones de los reguladores de crecimiento vegetales; IBA y Cinetina que producirán el mayor número de brotes *de novo* con fines de conservación de *A. durangensis* por medio de un soporte de inclinación en el laboratorio de Cultivo de Tejido Vegetales, de la División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato Salamanca de la Universidad de Guanajuato, Ex Hacienda El Copal, Irapuato, Guanajuato, México.



Figura 1. *A. durangensis*. Foto perteneciente a la Colección Nacional de Agaves UG-SAGARPA, Acceso No. 40.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el sistema de inmersión temporal de *A. durangensis*, se utilizó el medio de cultivo líquido (Murashige and Skoog, 1962) al 50%, adicionando un balance con reguladores de crecimiento vegetales en distintas concentraciones (Ácido indol-3-butírico y Cinetina) correspondientes a cada tratamiento que se muestra en la tabla 1. Se plantearon 12 tratamientos con 3 repeticiones cada uno, que hacen un total de 36 unidades

experimentales. El pH por tratamiento fue ajustado a 5.7 – 5.8.

Se vertieron 50 ml del medio Murashige and Skoog (MS) dentro del frasco, cada uno con su malla y tapones, fueron esterilizados durante 20 minutos a una temperatura de 120° a una presión de 1.5 PSI.

Los frascos esterilizados fueron trasladados a la cámara de flujo laminar, mientras se esperaba a que estuvieran a temperatura ambiente, se colocó un plato aluminio, se esterilizaron las pinzas y bisturí con el mechero como se muestra en la imagen 1, se desinfectó con alcohol al 100%. Los explantes de *A. durangensis* accesión No. 40 fueron obtenidos de la Colección Nacional de Agaves UG-SAGARPA, el procedimiento seguido fue sacar los explantes del medio MS sólido al 50% con sus condiciones estériles dentro de la campana de flujo donde se realizaron los cortes necesarios para obtener los 36 explantes totalmente limpios y sin raíces.

Los explantes se establecieron en el biorreactor de inmersión lo cual se llevó a cabo dentro de la campana de flujo laminar, colocando un explante por frasco con medio, fue cerrado con los tapones y sellado con cita plástica. Se colocaron dentro del cuarto de crecimiento, iluminados con una lámpara fluorescente, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad con una temperatura de 28 °C.

Finalmente, los 36 frascos con los 12 tratamientos se colocaron en un soporte de inmersión temporal durante 1 minuto como tiempo de inversión cada 72 horas. Al final se realizaron 11 inmersiones a partir de la fecha 12 junio hasta el 19 julio de 2017. Cada semana se realizaron mediciones de los 4 parámetros a evaluar: número de puntas, número de raíces, primordios de brotes generados de *novo* y número de hojas necrosadas.

Se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5%, para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos. De

existir diferencias significativas se aplicó una prueba de medias de Tukey para determinar el tratamiento más efectivo. El software utilizado para el análisis estadístico fue Infostat ® versión 2016.



Imagen 1. Esterilización de pinzas y bisturí con el mechero.

Tabla 1. Diseño Experimental de la investigación de Micropropagación de *Agave durangensis*

CIN \ IBA	0.3 mg/L	0.5mg/L	1mg/L	3mg/L
3mg/L	T1	T2	T3	T4
5mg/L	T5	T6	T7	T8
10mg/L	T9	T10	T11	T12

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bajo las condiciones experimentales que se realizó el experimento se analizaron cuatro variables de importancia (número de hojas, número de raíces, primordios de brotes generados de *novo* y puntas necrosadas) que permiten determinar si los reguladores de crecimientos evaluados inciden en el crecimiento y desarrollo del *A. durangensis*.

La primera variable evaluada, que fue el número de hojas, no presentó diferencias significativas, lo que demuestra que ninguno de los tratamientos influyó en el desarrollo de las hojas (Tabla 2). En

este sentido, los tratamientos evaluados no incidieron en la variable respuesta; resultados similares a los reportados por Godoy (2015).

En el caso de las hojas necrosadas, el tratamiento 11 compuesto por 1 mg/L IBA y 10 mg/L CIN presentó un menor número de hojas necrosadas respecto al resto de los tratamientos, por lo que dicho tratamiento se recomienda para fortalecer el desarrollo de la planta, ya que el número de hojas activas es mayor aumentando la actividad fotosintética de las mismas (Tabla 2). En un estudio desarrollado por Gonzáles (2015) en propagación de *A. durangensis* en sistemas de inmersión temporal tampoco se encontró un tratamiento que mostrara una diferencia marcada, por lo que es necesario realizar estudios similares y corroborar dichos resultados.

En cuanto a la variable de mayor importancia en la investigación, que es el número de primordios de brotes generados de *novo* se determinó que ningún tratamiento mostró diferencias significativas respecto al resto, según el análisis de ANDEVA, por lo que ningún balance de reguladores de crecimiento fue significativo en la formación de primordios, aunque estadísticamente el tratamiento 12 (Imagen 2) compuesto por 3 mg/L IBA y 10 mg/L CIN presentó la media más alta de brotes *novo* con 3.33 (Tabla 2) por lo que se recomienda para el uso de reguladores de micropropagación *in-vitro*. (Tabla 2). Un estudio elaborado por Montejo (2016) sobre el efecto que tienen las hormonas vegetales sobre el desarrollo de *novo* de los brotes adventicios en la planta de *A. durangensis* no se observó algún tratamiento que mostrara una diferencia marcada. Uno de los factores que pudiera influir en la formación de brotes *de novo* es la intensidad lumínica, variable evaluada por Montejo (2016) y Rodríguez (2010) en donde se demuestra que la calidad de luz incide significativamente en la formación de embriones somáticos y que es un factor importante para la propagación de especies de *A. durangensis in vitro*.

La última variable evaluada en esta investigación fue el número de raíces de la planta *A. durangensis* y se observó que no hubo tratamiento que presentara diferencias significativas (Tabla 2) En el estudio desarrollado de Godoy (2015) en la combinación de hormonas para el crecimiento de raíz, se obtuvieron resultados similares lo que demuestra que los reguladores evaluados no influyen en el desarrollo de raíces.

Tabla 2. Prueba Tukey con separación de medias y diferentes variables número de hojas, número de hojas necrosadas, número de brotes de *novo* y número de raíces de la *Agave durangensis*.

TRATAMIENTOS	NÚMERO DE HOJAS	NÚMERO DE HOJAS NECROSADAS	NÚMERO DE BROTE DE NOVO	NÚMERO DE RAÍCES
T1	2.67/A	1.67/AB	1.00/A	2.33/A
T2	3.00/A	2.33/AB	0.00/A	1.00/A
T3	3.00/A	0.67/AB	0.00/A	2.33/A
T4	2.67/A	2.00/AB	1.33/A	1.33/A
T5	2.67/A	0.67/AB	0.33/A	0.33/A
T6	2.33/A	1.67/AB	0.00/A	1.00/A
T7	1.33/A	1.00/AB	0.00/A	1.33/A
T8	2.00/A	1.33/AB	0.67/A	1.67/A
T9	1.67/A	1.33/AB	2.67/A	1.00/A
T10	3.33/A	0.67/AB	0.00/A	1.00/A
T11	4.33/A	0.00/B	0.33/A	1.00/A
T12	3.33/A	3.67/A	3.33/A	1.00/A

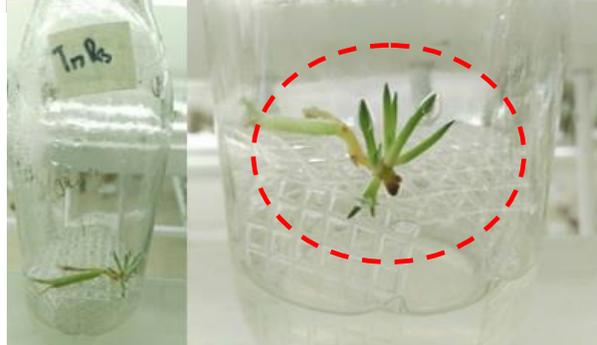


Imagen 2. Explante con primordios de brotes *de novo* (en el círculo gris) en explante de *A. durangensis*.

CONCLUSIONES

La metodología de sistemas de inmersión temporal utilizada durante la investigación es la adecuada para la evaluación de distintas variables en la micropropagación de *A. duranguensis*.

Se determinó por medio de un ANDEVA que los tratamientos no presentan diferencias significativas en las variables evaluadas (número de hojas, número de raíces, primordios de brotes generados *de novo* y puntas necrosadas)

El tratamiento 12 compuesto por (3 mg/L IBA y 10 mg/L CIN), presentó la mayor media 3.33 de todos los tratamientos en cuanto a los primordios de brotes generados *de novo*, por lo que es necesario realizar más investigaciones con este tratamiento y determinar si el mismo influye en la formación de brotes *de novo*.

El tratamiento 11 compuesto por (1 mg/L IBA y 10 mg/L CIN) presentó menor número de hojas necrosadas, por lo que es un tratamiento a tomar en cuenta debido a que el número de hojas activas es mayor respecto a los otros tratamientos.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada le quiero dar gracias a Dios por permitir realizar todos mis retos, también a la Universidad San Carlos de Guatemala por apoyarme incondicionalmente y a la Universidad de Guanajuato por abrirme las puertas para desarrollarme académica y profesionalmente.

El presente trabajo fue realizado bajo la supervisión del Dr. Héctor G. Nuñez Palenius, responsable de la Colección Nacional de Agaves UG-SAGARPA.

Rebeca Ramírez y Claudio Bernardo técnicos del laboratorio de cultivos vegetales, a quienes me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento y hacer posible la realización de este estudio.

REFERENCIAS

- [1] Olivas, U., Valdez, J., Aldrete, A., González, M. y Castillo G., (2007) Áreas con aptitud para establecer plantaciones de Maguey Cenizo: Definición mediante Análisis Multicriterio y SIG. *Revista fitotecnica mexicana* 30 (4), 411-419.
- [2] Park, S.N. 1998. Los incomparables agaves y cactus. México. pp.14-17. Ed. Trillas.
- [3] Barraza, S., Domínguez, P., Motiel, E., Navar, J. y Díaz, M. (2014) La Producción de Mezcal en el Municipio de Durango 10 (6) 65-74
- [4] Loera, H., Corral, J., Montiel, E., Díaz, M., Orona, I., Rodríguez, E., Ojeda, G. y Lliana, S. (2012) Factores Ecológicos de una Comunidad de Agave duranguensis en la Sierra de Registrillo Durango, México 12 (1) 1-142
- [5] Rodríguez Sahagún A, et al. (2010). Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of Agave tequilana Weber var. Azul. 10(4). 271-275. Dio: 10.1007/s11240-010-9815-4
- [6] Montejo, A. y Nuñez, H. (2016) Utilización de un sistema de inmersión temporal (SIT) para multiplicar plantas ornamentales de *Agave victoriae-reginae* (t. moore) 2 (1) 1429-1433
- [7] González, B. y Nuñez, H. (2015) Micropropagación de Agave duranguensis en un sistema de inmersión temporal (SIT) 1 (2) 8-13
- [8] Godoy, C. y Nuñez, H. (2015) Micropropagación de Agave duranguensis en un sistema de inmersión temporal (SIT) 1 (2) 60-65
- [9] García, A. (2007) Los Agaves de México (087) 14-23