

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

Cesar Guillermo Godoy Díaz (1), Héctor Gordon Núñez Palenius (2)

1 [Licenciatura en ingeniería agronómica, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [gametoxl@gmail.com]

2 [Departamento de Agronomía, División Ciencias de la Vida, Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [palenius@ugto.mx]

Resumen

El *Agave durangensis*, pertenece a la familia *Agavaceae* y puede reproducirse por semilla, bulbillo y escasamente por rizomas. Su crecimiento es muy lento y la maduración toma de 8 a 10 años. La falta de métodos eficientes de propagación para esta especie, ha causado que se usen directamente las poblaciones silvestres sin el reemplazo en su ambiente natural, reduciendo así el número de ejemplares de esta especie, por lo cual el desarrollar un sistema eficiente de micropropagación es fundamental. Por lo tanto el objetivo de nuestro trabajo fue determinar las concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) N6-Benciladenina (BA) y Ácido Indol-3-butírico (IBA), que induzcan el mayor número de brotes en *Agave durangensis* en un sistema de inmersión temporal (SIT). Los resultados obtenidos en 28 días fueron que 16 explantes que equivalen al 33.33% de los 48 explantes iniciales, produjeron nuevos brotes, los cuales estuvieron presentes en 11 de los 16 tratamientos; los cuales equivalen al 68.75% de los 16 tratamientos. El tratamiento G5 produjo un promedio de 2.67 nuevos brotes en 28 días. Se presentaron diferencias significativas en los tratamientos G8 y G11 para anchura del dosel y G2 y G6 con el G15 para número de raíces.

Abstract

The *Agave durangensis*, belongs to the *Agavaceae* family and it can be reproduce by seed, bulblet or less efficiently by rhizomes. It grows very slow and maturation takes around 8 to 10 years, the lack of efficient methods of multiplication for *Agave durangensis* has caused to be used directly from the wild populations, without replacing in their natural environment, thereby reducing the number of specimens. So, to develop an efficient micropropagation method is fundamental. Therefore the aim of our study was to determine the concentrations of plant growth regulators (RCV) N6-benzyladenine (BA) and indole-3-butyric acid (IBA), which have the greater effect on *Agave durangensis* de novo shoot production in a temporary immersion system (TIS). The obtained results showed that 16 explants, which were equivalent to 33.33% out of 48 initial explants, gave new shoots. These new shoots were found in 11 out of 16 treatments, corresponding to 68.75% of the 16 treatments. The G5 treatment produced 2.67 new shoots, on average, in 28 days. Significant differences in G8 and G11 treatments for canopy width, and in G2 and G6 and G15 treatments for root number were observed.

Palabras Clave

Agave durangensis; BA; IBA; 1 min/día; Organogénesis

INTRODUCCIÓN

Generalidades

La familia *Agavaceae* abarca ocho géneros, *Agave*, *Manfreda*, *Furcraea*, *Yucca*, *Hesperaloe*, *Beschermeria*, *Polianthes*, y *Prochnyanthes*, de los cuales 150 especies y 36 taxas infraespecíficos representan el 75 por ciento del total de las especies de la familia, las cuales existen en México, siendo la zona central considerada como el sitio con mayor biodiversidad [1].

Agave durangensis

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 [2].

La planta puede alcanzar los dos metros de diámetro, tiene hojas verde 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].

El agave cenizo se utiliza como materia prima para producir bebidas alcohólicas como el mezcal, para la producción de fructanos, bioetanol y se espera poder utilizar el bagazo que queda después de la molienda por su contenido de lignocelulosa [3].

Micropropagación

La falta de métodos eficientes de propagación para la especie de *Agave durangensis* ha causado que se usen directamente las poblaciones silvestres sin el reemplazo en su ambiente natural, reduciendo así el número de ejemplares de esta especie. Además el mejoramiento genético de esta especie es difícil, ya que son monocárpicas y la floración puede durar hasta 30 años [4]. Por lo

anterior, el desarrollar un sistema de micropopagación eficiente para éste agave es fundamental. Asimismo se espera que el sistema de inmersión temporal sea más productivo que el de medio sólido dado a que hay una mejor distribución de nutrimentos y reguladores de crecimiento vegetal.

Hipótesis

La micropopagación *in vitro* induce un incremento en la producción de brotes de *Agave durangensis*, por medio de un Sistema de Inmersión Temporal (SIT).

Objetivo

Determinar las **concentraciones** de reguladores de crecimiento vegetal (**RCV**) N6-Benziladenina (**BA**) y Ácido Indol-3-butírico (**IBA**), que induzcan una mayor producción de brotes en ***Agave durangensis*** en un sistema de inmersión temporal (**SIT**).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 16 tratamientos con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) utilizando como base la literatura reportada para *Agave durangensis* [4], teniendo los parámetros de 4.44 μmol de Benziladenina (BA) con equivalencia de 1mg/L y 0.49 μmol de Ácido indol-3-butírico (IBA) equivalencia de 0.1 mg/L, teniendo una relación de 1 a 10, por lo cual se asignaron para el BA las concentraciones de 5mg/L, 3mg/L, 1mg/L, 0.1 mg/L, y para el IBA de 0.5 mg/L, 0.3 mg/L, 0.1 mg/L, 0.001, y de sus 16 combinaciones resultaron los tratamientos como se muestra en la Tabla 1.

Se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento por lo cual se lavaron 48 frascos de vidrio de jugos del Valle de 413 ml y se etiquetaron según el tratamiento y número de repetición (ejemplos G1R1, G2R2, G3R3, etc.).

Se cortaron 48 soportes de malla plástica en forma de semicubo con 4x4 cm de área central y altura de 3x3 cm de mayas de plástico resistente al calor

húmedo de la autoclave. Se introdujeron en los frascos de cristal como se muestra en la Imagen 1.

Se perforaron 48 tapones de goma para introducirles una manguera rellena de algodón comprimido con los cuales se taparon los frascos como se muestra en la Imagen 2.

Se preparó medio de Murashige y Skoog 1962 (MS) al 100% con 15 g/L de glucosa, como se muestra en la Tabla 2, del cual se prepararon 1680 ml, los cuales fueron distribuidos en 105 ml por tratamiento y a su vez 35 ml de tratamiento por repetición según correspondiera. Para el BA e IBA se realizaron soluciones stock de 1 mg de BA o IBA en 1ml de agua purificada, diluyéndolos previamente con 2 gotas de KOH. De esta manera se hizo fácil su manejo y conversión en los tratamientos.

Se vació la cantidad y tipo de tratamiento correspondiente en cada frasco etiquetado, se taparon con papel aluminio y se esterizaron junto con los tapones en la autoclave a 121 °C, 15 lb/pulg², por 20 min.

Ya esterilizados los frascos y tapones se sacaron en caliente y se trasladaron a la campana de flujo laminar, mientras se esperaba a que estuvieran a temperatura ambiente se colocaron platos y un azulejo forrado de papel aluminio estériles, se esterilizaron las pinzas y bisturí con el mechero automático como se muestra en la Imagen 3, se desinfectaron con alcohol al 100% los frascos que contenían los 48 explantes de *Agave durangensis* de la accesión # 52 de la Colección Nacional de Agaves UG-SAGARPA, se introdujeron a la campana de flujo laminar. Se sacaron los explantes a utilizar y se limpiaron, disectaron, como se muestra en la Imagen 4.

Posteriormente se introdujeron los explantes en los frascos, se taparon con los tapones antes mencionados y se sellaron con plástico adherente como se muestra en la Imagen 5.

Finalmente se colocaron las 48 muestras en el cuarto de crecimiento por 28 días con una temperatura de 25–26 °C, iluminación dentro del frasco de 23–26 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ con lámparas fluorescentes de luz de día con un fotoperiodo de 16 horas luz/ 8 oscuridad, humedad relativa de 30-50%, y una inmersión de 1 min por día como se muestra en la Imagen 6.

Con la finalidad de alcanzar el objetivo que se establece en el presente trabajo se decidió utilizar un análisis factorial con separación de medias mediante la prueba de Tukey con el software STATGRAPHICS Centurion, donde se evaluaron las siguientes variables del explante por semana: número de puntas, altura, anchura del dosel, número de brotes y número de raíces como se muestra en la Tabla 3, de lo cual se tomó la diferencia del dato de la última semana menos el dato tomado al inicio del experimento, posteriormente se hizo un promedio entre las 3 repeticiones para así poder utilizarlo para ésta prueba.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en 28 días que duró el experimento fueron que 16 explantes que equivalen al 33.33% de los 48 iniciales dieron nuevos brotes, y se encontraron en 11 de los 16 tratamientos probados. Estos 11 tratamientos equivalen al 68.75% de los 16 tratamientos, resaltando el tratamiento G5 (3 mg/L BA + 0.5 mg/L IBA) que produjo un promedio de 2.67 nuevos brotes en 28 días. En un trabajo similar se obtuvieron 0.5 nuevos brotes en 60 días, resaltando que en ese trabajo también se utilizó el tratamiento (1 mg/L BA + 0.01 mg/L IBA) el cual produjo 5.9 nuevos brotes en 60 días, teniendo en cuenta que nuestro método tiene un menor costo dado a que no se utiliza agar. Además, sería necesario alargar el tiempo de nuestro experimento a 60 días para tener una comparación significativa con ese trabajo [4].

De acuerdo con el análisis estadístico para los valores de P Tabla 4, existe significancia solo para la formación de raíces y anchura de dosel, y para los demás resultados no existe significancia como se muestra en la Tabla 5.

Con respecto al análisis de separación de medias por la prueba de Tukey ($P \geq 95\%$), para número de puntas, altura y número de brotes no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos correspondientes, por lo contrario para anchura del dosel hubo diferencia entre los tratamientos G8 (0.17 cm) y G11 (2.5 cm) y para el número de raíces hubo diferencias entre los tratamientos G2 y G6 (0.33) con el G15 (3.33) como se muestra en la Tabla 5.

Cabe mencionar que los tratamientos G4 (5mg/L BA+ 0.001 mg/L IBA) y G11 (1 mg/L BA + 0.1 mg/L IBA) produjeron en promedio 2 puntas en 28 días respectivamente y el tratamiento G15 (0.1 mg/L BA + 0.1 mg/L IBA) produjo un promedio de 3.33 raíces en 28 días.

CONCLUSIONES

Se propone el tratamiento G5 (3 mg/L BA + 0.5 mg/L IBA) que produjo un promedio de 2.67 nuevos brotes como una opción eficiente para obtener mayor micropropagación de *Agave durangensis* en 28 días.

Para anchura del dosel el tratamiento G11 tuvo mayor resultado con 2.5 cm.

Para número de raíces el tratamiento G15 indujo a un mayor desarrollo con 3.33.

Se sugiere alargar el tiempo del experimento por lo menos a los 60 días para tener resultados más significativos.

REFERENCIAS

- [1] García-Mendoza, A. y Galván, R. 1995. Riqueza de las familias Agaváceas y Nolinaceae en México. Boletín Sociedad Botánica de México. 56, 7-24.
- [2] Park, S.N. 1998. Los incomparables agaves y cactus. México. pp. 14-17. Ed. Trillas.
- [3] Gschaedler A. 2012. POTENCIALIDADES DEL MAGUEY. Agroentorno. 145(15), 33-34. Recuperado de http://www.funprover.org/agroentorno/agro_sept012/potencialidadesdelmaguey.pdf
- [4] Ramírez-Malagón, R. Borodanenko, A. Pérez-Moreno, L. Salas-Araiza, M. D. Nuñez-Palenius H. G. Ochoa-Alejo, N. 2008. In vitro propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. Plant Cell Tiss Organ Cult. 94, 201-207. DOI: 10.1007/s11240-008-9405-x

ÍNDICE DE IMÁGENES Y TABLAS

Imagen 1: Frascos de cristal y malla doblada para soporte

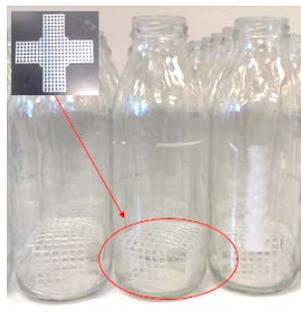


Imagen 2: Tapón con manguera rellena de algodón



Imagen 3: Esterilización de pinzas y bisturí



Imagen 4: Limpieza de explantes de *Agave durangensis*



Imagen 5: Sistema de Inmersión Temporal terminado



Imagen 6: Dando inmersión a las muestras en el cuarto de crecimiento



Tabla 1: Concentración de BA e IBA por cada tratamiento

IBA BA	0.5 mg/L	0.3mg/L	0.1 mg/L	0.001 mg/L
5 mg/L	G1	G2	G3	G4
3 mg/L	G5	G6	G7	G8
1 mg/L	G9	G10	G11	G12
0.1 mg/L	G3	G14	G15	G16

Tabla 2: Medio Murashige y Skoog 1962

Macronutrientes	100 mg/L
MgSO4	50 mg/L
Fe EDTA	20 mg/L
Micronutrientes	1 mg/L
Vitaminas	1 mg/L
Glucosa	15 g/L
pH	5.7-5.8
RCV	(Según tratamiento)

Tabla 3: Ejemplo del formato para la toma de datos

<i>Agave durangensis</i>						
Inicio (Miércoles 17 de junio del 2015)						
Muestra	Hojas			Hijuelos	Raíces	Observaciones
	Puntas	Altura (cm)	Anchura dosel (cm)	Cantidad	Cantidad	
G1 (1)	3	6	2	0	0	
G1 (2)	2	3.5	3	0	0	
G1 (3)	2	3.5	2.5	0	0	
G2 (1)	4	3.5	1.5	0	1	
G2 (2)	3	4	2.5	0	0	
G2 (3)	5	3.5	1.5	0	1	
G3 (1)	3	3	3	0	0	
G3 (2)	2	3	1.5	0	0	

Tabla 4: Valores de P obtenidos del análisis de varianza de los datos de la semana 4 menos la 0

Fuente de variación	Valores de P				
	Puntas	Alto	Dosel	Brotos	Raíces
TRATAMIENTO	0.098	0.541	0.094	0.334	0.005

Tabla 5: Separación de medias por la prueba de Tukey

Tratamientos	Comparación de medias				
	N° de puntas	Altura	Anchura del dosel	Brotos	N° de Raíces
G1	0.33 a	-0.17 a	1.67 ab	1.33 a	0.00 ab
G2	0.33 a	1.00 a	1.00 ab	1.33 a	-0.33 b
G3	1.00 a	1.50 a	1.67 ab	0.33 a	0.00 ab
G4	2.00 a	-0.33 a	0.83 ab	0.00 a	2.33 ab
G5	1.00 a	0.17 a	0.67 ab	2.67 a	0.00 ab
G6	1.00 a	1.17 a	0.83 ab	0.33 a	-0.33 b
G7	1.00 a	0.33 a	1.33 ab	0.67 a	0.00 ab
G8	1.00 a	0.00 a	0.17 b	1.00 a	0.00 ab
G9	1.00 a	0.33 a	1.17 ab	1.33 a	0.33 ab
G10	1.66 a	0.00 a	1.00 ab	1.00 a	0.00 ab
G11	2.00 a	0.50 a	2.50 a	0.00 a	1.00 ab
G12	1.33 a	-0.17 a	1.17 ab	1.33 a	0.33 ab
G13	1.66 a	-0.17 a	0.83 ab	0.00 a	2.00 ab
G14	0.66 a	0.33 a	0.83 ab	0.00 a	1.67 ab
G15	0.66 a	-0.17 a	0.83 ab	0.33 a	3.33 a
G16	0.66 a	0.83 a	1.17 ab	0.00 a	1.33 ab