

Micropropagación de *Agave durangensis* en un Sistema de Inmersión Temporal (SIT)

Bianka Mónica González Durán (1), Héctor Gordon Núñez Palenius (2).

1 [Ingeniería en Biotecnología, Tecnológico de Monterrey Campus Querétaro] | Dirección de correo electrónico: [A01201915@ITESM.mx]

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

Resumen

El agave es una de las plantas más representativas de México. De las 200 especies que existen aproximadamente, 150 se encuentran en nuestro país. Debido al lento crecimiento de estas plantas y su baja tasa de reproducción sexual y asexual es difícil multiplicarla de forma masiva a través de métodos convencionales. El *Agave durangensis* Gentry es una especie endémica de nuestro país, es usado principalmente para la producción de pulque y mezcal de manera artesanal, razón por la cual las poblaciones silvestres se están viendo amenazadas debido a la sobreexplotación para fines comerciales. Una alternativa para su reproducción masiva es el uso de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En el presente trabajo se desarrolló el establecimiento de *Agave durangensis* Gentry en un Sistema de Inmersión Temporal, en diferentes medios líquidos adicionados con reguladores de crecimiento vegetal en distintas concentraciones, IBA y Cinetina. Se efectuaron 16 tratamientos por triplicado con el objetivo de determinar las concentraciones de IBA y Cinetina que más brotes *de novo* generaran al cabo de cuatro semanas de inmersión. El mejor tratamiento para la generación de brotes fue el tratamiento T6 con 0.3 mg/L de IBA y 3 mg/L de Cinetina.

Abstract

The Agave is one of the most representative plants in México. One hundred fifty Agave species, out of 200, exist in our country. Due to its slow growth and low rate of sexual and asexual reproduction, it is difficult its multiplication in massive ways through conventional methods. The *Agave durangensis* Gentry is an endemic plant species from our country, and it is mostly used as raw material for the production of mescal and pulque in a crafty way, this is the reason why the wild populations are being extinction-threatened because the commercial overexploitation. One alternative to the massive reproduction is the use of plant tissue culture *in vitro*. In this project the establishment of *Agave durangensis* Gentry in a Temporary Immersion System was achieved, the experiments included different liquid media with a variety of plant growth regulator concentrations, IBA and Kinetin. Sixteen treatments were made, in triplicate, with the objective to determine the IBA and Kinetin concentrations that will induce the greatest *de novo* shoot production after one month immersion. The best treatment to origin *de novo* shoots was T6 having 0.3 mg/L IBA and 3 mg/L Kinetin.

Palabras Clave

Agave durangensis Gentry; Sistema de Inmersión Temporal (SIT); IBA (Ácido Indol-3-butírico); Cinetina; *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

El agave es una de las plantas más representativas de México. La palabra agave proviene del griego *αγαυή* y significa “noble o admirable”, dicho nombre fue conferido por el naturalista Carlos Linneo. Esta planta tiene diversos usos, mismos que van desde alimento hasta la fabricación de papel [1]. De las 200 especies que existen aproximadamente, 150 se encuentran en nuestro país, lo que representa el 75%, más 36 que pertenecen a categorías infraespecíficas, con lo cual resultan ser un total de 186 taxones. La distribución geográfica de este género abarca desde el sur de los Estados Unidos de América hasta Colombia y Venezuela [2]. Debido al lento crecimiento de estas plantas, así como de su baja tasa de reproducción sexual y asexual es difícil su multiplicación de forma masiva por medio de métodos convencionales.

El *Agave durangensis* Gentry, también conocido como Agave cenizo es una especie endémica de nuestro país que crece de forma silvestre en colonias dispersas en suelos rocosos, matorrales y pastizales [3]. Esta especie crece principalmente en los estados de Durango y Zacatecas, en una región pequeña de la Sierra Madre Occidental, sin embargo, también ha sido encontrada en otros estados como Chihuahua, Distrito Federal y Sinaloa [4]. Los usos principales que se le dan a este maguey son la producción de pulque y mezcal de manera artesanal, razón por la cual las poblaciones silvestres de este Agave se están viendo amenazadas debido a la sobreexplotación de este recurso para fines comerciales. Puesto que este maguey es endémico de nuestro país, si se acaba no habrá manera de recuperarlo y se verá extinto para siempre, por consiguiente es muy importante la preservación de este recurso natural, así como reconocer que cada especie y variedad es única,

mismas que deben ser conservadas como recursos fitogenéticos de nuestro país.

Una alternativa es el uso de técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, el cual ofrece numerosas ventajas para la conservación y reproducción de plantas. En el presente trabajo se desarrolló el establecimiento de *Agave durangensis* Gentry en un Sistema de Inmersión Temporal, haciendo uso de la técnica de Micropropagación *in vitro*, en diferentes medios líquidos (Murashige and Skoog, 1962) adicionados con reguladores de crecimiento vegetal en distintas concentraciones (Ácido indol-3-butírico y Cinetina).

Este estudio se efectuó con el objetivo de determinar la concentración de reguladores de crecimiento vegetal IBA y Cinetina que origine más brotes *de novo* en el *Agave durangensis* Gentry en un Sistema de Inmersión Temporal (SIT) a través de un análisis estadístico ANOVA. Al cabo de un mes del establecimiento se evaluó cuál de los tratamientos fue el que originó mayor número de brotes *de novo* en los explantes de *Agave durangensis* Gentry pertenecientes a la Colección Nacional de Agaves UG-SAGARPA, accesión # 52 y se determinó la resolución a la hipótesis planteada para este estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema de Inmersión Temporal (SIT)

Se emplearon 48 frascos de vidrio, de jugo “del Valle”, de 413 ml para el establecimiento del Sistema de Inmersión Temporal, en el interior de cada frasco se colocó una malla de polietileno de 16 cm² de superficie, de forma cuadrada, a una altura de 3 cm del fondo de la botella. Para el sellado de las botellas se utilizaron tapones de goma con un orificio en la parte central por donde

se introdujo una manguerilla de 1 cm de diámetro rellena con algodón para que la planta recibiera ventilación.

Medio de crecimiento

El medio utilizado para los 16 tratamientos que se efectuaron fue MS al 100% (Murashige and Skoog, 1962) preparado con soluciones stock en las siguientes proporciones, macroelementos 50 ml/L, MgSO₄ 50 ml/L, Fe EDTA 10 ml/L, microelementos 1 ml/L, vitaminas 1 ml/L y glucosa 15 g/L. Posteriormente se agregaron las concentraciones de reguladores vegetales correspondientes a cada tratamiento, mismas que se muestran en la Tabla 1. En total se diseñaron 16 tratamientos con 3 réplicas cada uno, cada tratamiento fue preparado con soluciones stock 1 mg/ml de IBA y Cinetina respectivamente. El pH por tratamiento fue ajustado a 5.7-5.8.

Se depositaron 35 ml de medio por frasco y después el medio junto con los frascos y tapones preparados fueron esterilizados durante 20 minutos a 121 °C o 20 PSI.

Establecimiento de explantes de *Agave durangensis* Gentry en un SIT

Los explantes de *Agave durangensis* Gentry se obtuvieron de la Colección Nacional de Agaves UG-SAGARPA, accesión #52. Dado que la colección cuenta con cultivos *in vitro* el procedimiento que se siguió fue sacar los explantes del medio MS sólido al 50% en condiciones estériles dentro de la campana de flujo laminar, ahí se efectuaron los cortes necesarios para obtener 48 explantes saludables y vigorosos, cada uno con 2 o 3 puntas, totalmente limpios y sin raíces. En seguida se colocaron en frascos con medio MS nuevo y se guardaron en la cámara de crecimiento por un día.

El establecimiento de los explantes en el biorreactor de Inmersión Temporal se llevó a cabo dentro de la campana de flujo laminar, se colocó un explante por frasco con medio. Posteriormente los frascos fueron cerrados con los tapones de goma estériles y sellados con cinta plástica adherible (IMAGEN 1). Finalmente los 48 frascos, con los 16 tratamientos por triplicado se colocaron dentro de la cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Cada 24 horas se les dio inmersión a todos los frascos durante 1 minuto y cada semana se realizaron mediciones de los 6 parámetros a evaluar: altura de la planta, anchura del dosel, número de puntas, número de raíces, brotes y puntas necrosadas.



IMAGEN 1: Explante de *Agave durangensis* en un SIT

Tabla 1: Diseño experimental

IBA	0.5 mg/L	0.3 mg/L	0.1 mg/L	0.001 mg/L
Cinetina				
5 mg/L	T1	T2	T3	T4
3 mg/L	T5	T6	T7	T8
1 mg/L	T9	T10	T11	T12
0.1 mg/L	T13	T14	T15	T16

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para cada tratamiento a partir de realizar una comparación de medias (Prueba Tukey) con una significancia del 95%. Se puede apreciar que para la altura de la planta ningún tratamiento contribuyó representativamente, sin embargo para la anchura del dosel el tratamiento T14 fue el más significativo con una media de 4.8, destacándose como el menos significativo el tratamiento T13 con una media de 2.0667. Para el número de puntas y brotes generados no hubo ningún tratamiento representativo respectivamente. Por otra parte, el

tratamiento que más favoreció el crecimiento de raíces en el *Agave durangensis* Gentry fue el etiquetado con el número 14 con una media de 4.33, siendo los tratamientos T13 y T16 los menos favorables para la inducción de raíces. El número de puntas necrosadas promedio fue de una y el tratamiento que originó más necrosis fue el tratamiento T15 en contraste con los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5, T7, T8, T9 y T10 que fueron los que no ocasionaron muerte en puntas.

El objetivo planteado para el proyecto fue determinar las concentraciones de regulares vegetales IBA y Cinetina que más brotes *de novo*

Tabla 2: Prueba Tukey para Altura de la Planta, Anchura de Dosel, No. De Puntas, No. De Raíces, No. De Brotes generados y No. De puntas necrosadas.

Tratamientos	(Número de muestras) N	Altura de la Planta	Anchura del Dosel	Número de Puntas	Número de Raíces	Número de Brotes generados	Número de puntas necrosadas
T1	3	A	AB	A	AB	A	B
T2	3	A	AB	A	AB	A	B
T3	3	A	AB	A	AB	A	B
T4	3	A	AB	A	AB	A	B
T5	3	A	AB	A	AB	A	B
T6	3	A	AB	A	AB	A	AB
T7	3	A	AB	A	AB	A	B
T8	3	A	AB	A	AB	A	B
T9	3	A	AB	A	AB	A	B
T10	3	A	AB	A	AB	A	B
T11	3	A	AB	A	AB	A	AB
T12	3	A	AB	A	AB	A	AB
T13	3	A	B	A	B	A	B
T14	3	A	A	A	A	A	AB
T15	3	A	AB	A	AB	A	A
T16	3	A	AB	A	B	A	AB

Donde las medias que no comparten una misma letra son significativamente diferentes.

produjeran, para lo cual se estableció la siguiente hipótesis: “Los tratamientos con IBA y Cinetina pueden generar brotes *de novo* en el *Agave durangensis* Gentry en un Sistema de Inmersión Temporal.”

El análisis ANOVA de tipo factorial que se hizo (Significancia 95%) para evaluar el nivel de representatividad que tuvo la interacción de ambos reguladores vegetales (IBA y Cinetina) en la generación de brotes, arrojó que la mayor varianza experimentada en los 16 tratamientos se debió efectivamente a ambos reguladores. Además, como se puede observar en la IMAGEN 2, la Cinetina es quien juega un papel predominante en la varianza de los tratamientos en comparación del Ácido Indol-3-butírico. No obstante, el P value es superior a 0.05 por lo que se determina que no hubo ningún tratamiento que originara resultados notables en cuanto a la generación de brotes. No así para la generación de raíces, donde a partir del mismo ANOVA multifactorial (IMAGEN 3) se determinó que la interacción de IBA con Cinetina tienen un efecto directo en la generación de raíces en el *Agave durangensis* Gentry, siendo el mejor tratamiento el de las concentraciones 0.3 mg/L de IBA con 0.1 mg/L de Cinetina.

A pesar de que en la comparación de medias no se observa un tratamiento sobresaliente en específico, cabe mencionar que esta prueba pierde significancia cuando es utilizada para evaluar más de 6 muestras, en este caso se compararon 16 tratamientos. A diferencia de esto, a través del análisis de las interacciones multifactoriales de los reguladores vegetales, sí se pudo determinar un tratamiento como el mejor para la generación de brotes, dicho tratamiento es el que contiene las concentraciones 0.3 mg/L de IBA con 3 mg/L de Cinetina, con una media de 4.333.

El análisis ANOVA llevado a cabo para este diseño experimental no fue un diseño robusto para todos

los parámetros, ya que algunas muestras no cumplían con la distribución normal dentro de sus respectivos grupos y tratamientos por lo que se recomienda para futuros diseños hacer un Check adequacy para aumentar así el nivel de confianza del ANOVA, además de probar un rango más grande de concentraciones tanto para Cinetina e IBA dentro de un cultivo in vitro con medio sólido y líquido en un SIT al mismo tiempo que se efectuó un control de *Agave durangensis* Gentry con proporciones de puntas, anchura de dosel y altura de la planta con poca desviación estándar.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
IBA	3	2.500	2.500	0.833	0.58	0.633
Cinetina	3	11.500	11.500	3.833	2.67	0.064
IBA*Cinetina	9	22.000	22.000	2.444	1.70	0.130
Error	32	46.000	46.000	1.437		
Total	47	82.000				

IMAGEN 2: Tabla ANOVA factorial para Brotes originados.

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
IBA	3	0.333	0.333	0.111	0.07	0.975
Cinetina	3	18.167	18.167	6.056	3.88	0.018
IBA*Cinetina	9	46.167	46.167	5.130	3.28	0.006
Error	32	50.000	50.000	1.562		
Total	47	114.667				

IMAGEN 3: Tabla ANOVA factorial para Raíces generadas.

CONCLUSIONES

No obstante que los resultados para generación de brotes empleando Cinetina e IBA no fueron los esperados, se determinó que la interacción de estos reguladores vegetales tiene un gran potencial para la inducción de raíces en el *Agave durangensis* Gentry en un Sistema de Inmersión Temporal, así el mejor tratamiento para generación de raíces fue el tratamiento T14 (0.3 mg/L de IBA con 0.1 mg/L de Cinetina). Para la generación de brotes *de novo* el mejor tratamiento

fue el tratamiento T6 (0.3 mg/L de IBA con 3 mg/L de Cinetina), para altura de la planta fue el tratamiento T12 (0.001 mg/L de IBA con 1 mg/L de Cinetina), para el incremento de la anchura del dosel fue el tratamiento T14 (0.3 mg/L de IBA con 0.1 mg/L de Cinetina) y el tratamiento que más necrosis en puntas generó fue el T15 (0.1 mg/L de IBA con 0.1 mg/L de Cinetina).

Finalmente la hipótesis planteada se acepta ya que el Ácido Índol-3-butírico y la Cinetina sí pueden generar brotes de novo en el Agave durangensis Gentry en un Sistema de Inmersión Temporal, puesto que únicamente tres tratamientos (T12, T13 y T15) fueron los que no generaron brotes de los 16 que se llevaron a cabo en el lapso de cuatro semanas de inmersión.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dar un especial agradecimiento al Dr. Héctor Gordon Núñez Palenius quien fue mi asesor durante este trabajo por la atención brindada para mi persona y el proyecto, por la calidad de persona que es y por ofrecer su completo apoyo para que este proyecto finalizara de la mejor manera posible. También le quiero agradecer a la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca por ofrecerme la oportunidad de realizar una estancia de investigación científica en este verano 2015.

Por último a mis compañeras de laboratorio Ruth Medina Guzmán y María del Carmen Durán Cuj agradezco su apoyo y ayuda durante todo el proyecto, indudablemente son compañeras ejemplares.

REFERENCIAS

- [1] Academia Mexicana del Tequila. (2001). El Agave. Fecha de consulta 16 de julio de 2015. Recuperado de <http://www.acamextequila.com.mx/amt3/elagave.html>
- [2] García, A. (2007, Julio). Los agaves de México. Fecha de consulta 16 de julio de 2015. Recuperado de http://www.alumno.unam.mx/algo_leer/AgaveMexico.pdf
- [3] Valdez, L. S. (2011, Julio). Obtención de un surfactante a partir de biomasa residual de Agave durangensis y su en la de arsénico por la técnica de aglomeración esférica. Fecha de consulta 17 de julio de 2015. Recuperado de <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/15761/Tesis%20doctoral%20Obtencion%20de%20saponinas%20para%20remocion%20de%20ars%C3%A9nico.pdf?sequence=1>
- [4] Instituto de Biología UNAM. (2009). Colecciones Biológicas. Fecha de consulta 17 de julio de 2015. Recuperado de Agave durangensis Gentry: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:AG A?f=Agavaceae&s=Agave+durangensis+Gentry>