

UTILIZACIÓN DE UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT) PARA MULTIPLICAR PLANTAS ORNAMENTALES DE AGAVE VICTORIAE-REGINAE (T. MOORE)

Montejo Guzmán, Adolfo Basilio (1), Núñez Palenius, Héctor Gordon (2)

1 Ingeniería Agronómica en sistemas de Producción Agrícola, Universidad de San Carlos de Guatemala | Dirección de correo electrónico: montejoadelso@gmail.com

2 División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato –Salamanca, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: palenius@ugto.mx

Resumen

Agave victoriae-reginae es una especie demandada para uso ornamental, con la particularidad de ser una especie endémica de México. Actualmente es catalogada como especie en peligro de extinción por diversos factores, en los que resaltan la colecta indiscriminada para ser comercializada nacional e internacionalmente y la destrucción de su hábitat, y sumado a esto, sus características intrínsecas como ciclo de vida largo (8 años) y la nula formación de hijuelos. Ante la problemática antes mencionada se realizó el establecimiento de un sistema de inmersión temporal para determinar un balance de reguladores de crecimiento y una intensidad lumínica que genere la mayor cantidad de brotes por explante, para la multiplicación y conservación de plantas de *A. victoriae-reginae*. La investigación dio como resultado que el mejor tratamiento para la generación de primordios de brotes de *novo* en explantes fue utilizar un balance correspondiente a 0.05 mg.L^{-1} de Thidiazuron y 1 mg.L^{-1} de Bencilaminopurina y una intensidad lumínica de $62.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ utilizando un ciclo de inmersión de 1 minuto cada 72 horas.

Abstract

Agave victoriae-reginae is a highly-appreciate species for ornamental use, with the distinction of being an endemic species of Mexico. *A. victoriae-reginae* is currently listed as endangered species due to various factors, such as the indiscriminate collection to be marketed nationally and internationally and the destruction of its habitat. Moreover, this agave plant has a long life cycle (8 years) without the formation of offshoots. In view of the aforementioned problems establishing a temporary immersion system was carrier out to determine a balance of plant growth regulators and a luminous intensity that generates the greatest number of shoots per explant, for multiplication and conservation of plants *A. victoriae-reginae*. The results depicted that the best treatment for the axillary shoot induction was the use of a corresponding balance to 0.05 mg.L^{-1} Thidiazuron and 1 mg.L^{-1} benzylaminopurine at the rate of $62.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ luminous intensity in an immersion cycle of 1-minute every 72 hours.

Palabras Clave

Sistema de inmersión temporal; *Agave victoriae-reginae*; Thidiazuron; Bencilaminopurina

INTRODUCCIÓN

El género *Agave* es un grupo de plantas que se encuentran únicamente en los territorios del continente americano, reportándose una cantidad aproximada de 200 especies, distribuidos desde el sur de Estados Unidos, hasta territorios de Venezuela y Colombia. México es el país con la mayor cantidad de especies de *Agaves*. Los registros establecen que la cantidad de especies de *Agaves* en México ascienden a 150, lo que corresponde al 75% del total de especies existentes. También es importante mencionar, que, del total de especies del género *Agave* reportadas en México, el 69% de los taxones son endémicos en diferentes estados [1].

Dentro de la gran cantidad de especies endémicas del género *Agave* en México, se presenta *Agave victoriae-reginae*, una especie altamente demandada para uso ornamental tanto nacional como internacionalmente por sus características particulares [1]. Sin embargo *A. victoriae-reginae* es una especie catalogada en peligro de extinción por la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 y por el Apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) [2].

Para la propagación de *A. victoria-reginae*, es conveniente la utilización del cultivo *in-vitro* de material vegetal. Para la multiplicación de *Agaves*, regularmente se han utilizado sistemas de cultivo *in-vitro* con medios semisólidos, los cuales han tenido adecuados resultados. Sin embargo, en los últimos años una alternativa para mejorar el proceso de multiplicación, es la de los sistemas de inmersión temporal (SIT), ya que estos son más eficientes por la particularidad de combinar la ventilación de los tejidos de la planta, y el contacto intermitente entre la parte principal o toda la superficie de los explantes y el medio líquido, características que no poseen los sistemas que utilizan medios semisólidos [3]. Con el objetivo de determinar una combinación específica entre los reguladores de crecimiento Thidiazuron y Benzilaminopurina, y una intensidad lumínica que permitiera obtener brotes para la multiplicación con fines de conservación de *Agave victoriae-reginae*, se estableció el sistema de inmersión temporal por máquinas de inclinación y balancines 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.



Figura 1. *A. victoriae-reginae*. Foto ejemplar perteneciente a la Colección Nacional de *Agaves* UG-SAGARPA, Acceso No. 55.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cultivo *in-vitro* de *A. victoriae-reginae*, como medio basal se utilizó el medio de cultivo líquido propuesto por Murashigue & Skoog (MS) en 1962 al 50%, suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento y dispuestos a diferentes intensidades lumínicas, a manera de establecer un diseño experimental bajo el formato bi-factorial completamente al azar, con 3 repeticiones y 2 factores.

En el Sistema de inmersión utilizado para la presente investigación se utilizaron biorreactores a base de frascos de vidrio de una capacidad de 413 ml, los cuales contenían 50 ml del medio de cultivo MS líquido. En su interior, los envases de vidrio poseían una rejilla de plástico situada a 4 centímetros de la base del frasco, el cual sostenía al explante. Todos los biorreactores utilizaron un tapón de hule No. 6 con una abertura de 0.80 centímetros de diámetro en la cual se insertó una manguera transparente rellena de algodón, para la aeración del explante (imagen 2). Todos los materiales fueron esterilizados en una autoclave a 121 °C por 20 minutos a una presión de 15 psi. Para realizar las inmersiones se utilizó una estructura metálica que soporta los biorreactores (Imagen 2).

Los explantes utilizados fueron obtenidos de la colección nacional in-vitro de Agaves, camote de cerro y achiote UG-SAGARPA, los cuales provienen de la accesión número 55 de la colección nacional de Agaves UG-SAGARPA situados en campos de la División de Ciencias de la Vida campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato. Los explantes utilizados de *A. victoriae-reginae* poseían entre 3 a 4 puntas, sin raíces y brotes, todos estos fueron transferidos a los biorreactores estériles en una cámara de flujo laminar. El número total de explantes transferidos fue de 81 para 27 diferentes tratamientos.

Una vez transferidos los explantes estos fueron sellados con cinta plástica y se colocaron dentro de la cámara de incubación a razón de 3 diferentes intensidades lumínicas según los distintos tratamientos establecidos en el cuadro 1, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y una temperatura de 28 °C. Las intensidades luminosas fueron establecidas *a priori* utilizando un luxómetro HANNA 97500 ®. La intensidad luminosa correspondiente a $16 \pm 4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ es emitida por las lámparas fluorescentes, y por el otro lado, las intensidades lumínicas correspondientes a 62.8 ± 5 y $119 \pm 6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ son emitidas por lámparas LED T8 MAGG®. Es importante mencionar que los tratamientos que estuvieron bajo la influencia de luces LED, fueron establecidos dentro de un estante revestido de aluminio con la finalidad de que otras fuentes de luz no interfirieran en el experimento.

El ciclo de inmersión utilizado para todos los tratamientos fue de 1 minuto como tiempo de inmersión y 72 horas como frecuencia de inmersión (Nieto 2016). En total se realizaron 6 inmersiones para las fechas 27 y 30 de junio; y 3, 6, 9 y 12 de julio del 2016.

Una vez recabados los datos, estos fueron analizados con el paquete estadístico Infostat ® versión 2016l donde se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia del 5%. El análisis posANOVA se realizó por medio de la prueba DMS de Fischer con un 5% de significancia.



Figura 2. Sistema de Inmersión. A. Biorreactor. B. Soporte para los biorreactores.

Tabla 1: Descripción de los tratamientos utilizados en el experimento, en donde se observan 9 balances de reguladores y 3 intensidades lumínicas.

Tratamiento	Concentración de reguladores		Intensidad Luminosa $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
	TDZ mg.L^{-1}	BA mg.L^{-1}	
1	0.005	1	62.8
2	0.005	1	119
3	0.005	1	16
4	0.005	2	62.8
5	0.005	2	119
6	0.005	2	16
7	0.005	3	62.8
8	0.005	3	119
9	0.005	3	16
10	0.01	1	62.8
11	0.01	1	119
12	0.01	1	16
13	0.01	2	62.8
14	0.01	2	119
15	0.01	2	16
16	0.01	3	62.8
17	0.01	3	119
18	0.01	3	16
19	0.05	1	62.8
20	0.05	1	119
21	0.05	1	16
22	0.05	2	62.8
23	0.05	2	119
24	0.05	2	16
25	0.05	3	62.8
26	0.05	3	119
27	0.05	3	16

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El experimento se llevó a cabo en un lapso de 4 semanas, una para la preparación de los distintos medios de cultivo y el establecimiento del experimento y 3 semanas para la aplicación de las distintas intensidades luminosas y la aplicación del ciclo de inmersión. La variable respuesta del experimento fue la cantidad de *primordios de brotes* generados de *novo* ya que el tiempo mínimo necesario para la generación de brotes adecuados para el análisis estadístico es de 90 días [4]. Al realizar el análisis estadístico para determinar el mejor balance de reguladores de crecimiento y la mejor intensidad luminosa bajo un diseño experimental bi-factorial completamente al azar se obtuvieron los siguientes resultados: El ANOVA realizado, con un nivel de significancia del 5% establece que existe diferencia significativa entre la interacción balance de reguladores e intensidad luminosa ya que el valor de p determinado (0.0169) es menor al nivel probabilístico establecido (0.05 de significancia), lo que indica que existe suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula ($H_0=No$ existe diferencia significativa entre los tratamientos), por lo que es viable realizar un análisis posANOVA mediante la comparación múltiple de medias. La comparación múltiple de medias se realizó por medio de la prueba DMS de Fisher, con un nivel de significancia del 5%, los resultados pueden observarse en la Tabla 3:

Tabla 3: Prueba DMS de Fisher para determinar el balance de reguladores óptimo para generar primordios de brotes en SIT. En donde medias con literales iguales no son significativamente diferentes.

Tratamientos	Medias	n	E.E.	DMS Fisher			
T19	2,67	3	0,42	A			
T12	2	3	0,42	A	B		
T11	1,33	3	0,42		B	C	
T18	1,33	3	0,42		B	C	
T20	1,33	3	0,42		B	C	
T25	1,33	3	0,42		B	C	
T16	0,67	3	0,42			C	D
T10	0,67	3	0,42			C	D
T13	0,67	3	0,42			C	D
T8	0,33	3	0,42			C	D
T1	0,33	3	0,42			C	D
T3	0,33	3	0,42			C	D
T4	0,33	3	0,42			C	D
T7	0,33	3	0,42			C	D
T26	0,33	3	0,42			C	D
T24	0,33	3	0,42			C	D
T27	0	3	0,42				D
T5	0	3	0,42				D
T16	0	3	0,42				D
T2	0	3	0,42				D
T22	0	3	0,42				D
T14	0	3	0,42				D

T9	0	3	0,42				D
T6	0	3	0,42				D
T15	0	3	0,42				D
T21	0	3	0,42				D
T23	0	3	0,42				D

La prueba DMS de Fisher indica que el mejor tratamiento para la generación de primordios de brotes es el tratamiento número 19, el cual corresponde a un balance de reguladores de crecimiento vegetal de 0.05 mgL^{-1} de Thidiazuron y 1 mgL^{-1} de Bencilaminopurina a razón de una intensidad lumínica de $62.8 \pm 5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ con una media de 2.67 brotes por explante. El segundo mejor tratamiento corresponde al tratamiento 12, con un balance de reguladores de 0.01 mgL^{-1} de Thidiazuron y 1 mgL^{-1} a razón de una intensidad luminosa de 16, y los peores tratamientos corresponden al 27,5, 16,2,22,14,9,6,15,21 y 23, al no generar ningún primordio de brote por explante.

Son diferentes los factores que influyen en la micropropagación de plantas, pero los factores físicos juegan un papel determinante, entre estos la luz y la temperatura [6] y ante esta premisa son se han realizado estudios para evaluar el efecto del tipo y calidad de luz en especies micropropagadas *in-vitro*, sin embargo, los datos para la multiplicación en agaváceas solo se limitan a la inducción de embriones somáticos para la especie *Agave tequilana* Weber var. Azul. El estudio realizado por Rodríguez *et al* (2010). establecieron que el tipo y calidad de luz incide significativamente en la formación de embriones somáticos, considerándolo como un factor importante en la formación de cualquier protocolo de multiplicación de especies de Agave.

Muchos de los estudios realizados en el cultivo *in-vitro* de agaves han evaluado diferentes balances de reguladores para micropropagar diferentes especies, sin embargo, el estudio realizado por Núñez *et al*. (2015) específicamente evaluó 12 diferentes balances de reguladores de crecimiento vegetal para la inducción de brotes en *A. victoriae-reginae* bajo un SIT utilizando los mismos biorreactores de la presente investigación. El estudio evaluó el efecto del Ácido indolbutírico, Bencilaminopurina, Cinetina y Thidiazuron para la inducción de brotes, y determino que el mejor balance fue a razón de 0.53 mg.L^{-1} de Ácido indolbutírico y 0.1 mg.L^{-1} de Bencilaminopurina, pero cabe destacar que el estudio también determinó que el Thidiazuron sin ser mezclado con

otro regulador de crecimiento, fue el segundo mejor tratamiento para la inducción de brotes. Por otra parte, De Gyves *et al.* (2005) hacen mención que el TDZ es adecuado para la formación de brotes de novo en explantes de Agavaceas y que es adecuada para establecer cualquier sistema de multiplicación de agaves [7]

Los diferentes antecedentes citados en los anteriores apartados, establecen que tanto una intensidad específica de luz y una concentración específica de Thidiazuron y Bencilaminopurina generan efectos en la inducción de brotes en *A. victoriae-regina*. Por lo que los datos obtenidos a través de la prueba de DMS de Fisher son viables para establecer un sistema de inmersión temporal para propagar la especie ornamental *A. victoriae-reginae*. Por lo que se concluye, que el mejor balance de reguladores e intensidad lumínica para generar primordios de brotes a razón de 0.05 mg.L⁻¹ de Thidiazuron y 1 mg.L⁻¹ de Bencilaminopurina a una intensidad lumínica de 62.8 μmol m⁻² s⁻¹ en sistema de inmersión temporal por inclinación. Para datos significativos estadísticamente se recomienda que el estudio se realice a un tiempo mínimo de 90 días.



Figura 3. Explante con primordios de brotes de novo (en el círculo rojo) en explante de *A. victoriae-reginae*.

CONCLUSIONES

El mejor balance de reguladores de crecimiento vegetal para la generación de primordios de brotes en novo de explantes de *Agave victoriae-reginae*

corresponde a la cantidad de 0.05 mg.L⁻¹ de Thidiazuron y 1 mg.L⁻¹ de Bencilaminopurina.

La intensidad lumínica óptima para generar primordios de brotes de novo en explantes de *Agave victoriae-reginae* corresponde a una intensidad de 62.8 μmol m⁻² s⁻¹ emitida por lámparas LED.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Doctor Héctor Núñez Palenius y a los Técnicos de Laboratorio Rebeca Ramírez y Claudio Padilla por brindarme toda la ayuda para llevar a cabo el proyecto de investigación.

REFERENCIAS

- [1] García Mendoza AJ. (2007). Los agaves de México. Ciencias UNAM. 1(1). Recuperado de: http://www.alumno.unam.mx/algo_leer/AgaveMexico.pdf
- [2] González Elizondo M.S. (2011). El complejo *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae). Acta botánica mexicana 95(1). 65-74. Recuperado de: http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/HS001_Apendice_%208.pdf
- [3] Nieto González LA. (2016). Diseño de un Sistema de Inmersión Temporal para la micropropagación de la especie *Agave victoriae-reginae* (T. Moore). Instituto Politecnico Nacional. 15-51. Silao de la Victoria.
- [4] Núñez Palenius HG. et al. (2015). Micropropagation of *Agave victoriae reginae* (T. Moore) in a Temporary Immersion System.
- [5] Guo B, et al. (2011). Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator. Academic Journals, Northwest University. 10(45). 8985-8995. Dio: 10.5897/AJB11.636
- [6] Villalobos V.M. & Thorpe T.A. (S.f.). Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Roca W & Mroginski L. Cali, Colombia: Editorial XYZ.
- [7] 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