Revista Tlamati Sabiduria

Volumen II, Número 2. Septiembre-Diciembre 2010

Título del artículo.

Efecto de la concentración de citocininas en la generación de brotes a partir de meristemos basales en *Agave cupreata*.

Autores.

Manuel Salvador Domínguez Rosales
Pedro Cortés Genchi

Referencia bibliográfica:

MLA

Domínguez Rosales, Manuel Salvador y Pedro Cortés Genchi. " Efecto de la concentración de citocininas en la generación de brotes a partir de meristemos basales en *Agave cupreata*." *Tlamati*. II.1 (2010): 53-58. Print.

APA

Domínguez Rosales, M. S. y Cortés Genchi, P. (2010). Efecto de la concentración de citocininas en la generación de brotes a partir de meristemos basales en *Agave cupreata*. *Tlamati*, *II*(1).

ISSN: 2007-2066.
© 2010 Universidad Autónoma de Guerrero
Dirección General de Posgrado e Investigación
Dirección de Investigación

TLAMATI, es una publicación trimestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAG. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE Citocininas en la generación de brotes a partir de Meristemos basales en *Agave cupreata*

Foto: I. A.

Manuel Salvador Domínguez Rosales
Pedro Cortés Genchi

RESUMEN

La falta de sistemas eficientes de propagación es un factor que limita el aprovechamiento racional de varias especies de *Agave*, que en muchos casos han tenido una reducción peligrosa de sus poblaciones debido a la sobreexplotación de materiales silvestres. En este estudio se desarrollaron protocolos para la propagación *in vitro* de *Agave cupreata*. Como explantes se utilizaron tejidos meristemáticos extraídos de plántulas germinadas *in vitro*. Se logró la formación de brotes múltiples en meristemos basales en medio MS adicionado con 30 g L^{-1} de sacarosa, 8 g L^{-1} de agar y varios tratamientos con citocininas [6-bencilaminopurina (BA), 6-γ,γ-dimetilalilaminopurina (2iP), cinetina (Cin), tidiazurón (TDZ) y meta-topolina o N^6-(meta-hidroxibencil) adenina (MT)]. La eficiencia más alta en producción de brotes se obtuvo con 1.5 mg L^{-1} de BA, donde se generaron 10.5 brotes por explante. El enraizamiento de los brotes generados *in vitro* se obtuvieron en medio MS basal con una eficiencia del 93 %, y la frecuencia de supervivencia de las plantas una vez transferidas a suelo fue de 53 % en promedio.

Palabras clave: *Agave cupreata*, citocininas, micropropagación.

SUMMARY

The lack of efficient propagation systems is a factor that limiting the efficient utilization use of several species of *Agave*, that in many cases have had a dangerous reduction of their populations due to the over-exploitation of wild materials. In this work *in vitro* propagation protocols were developed for *Agave cupreata*. Meristematic tissues from *in vitro* germinated seedlings were used as explants. Multiple shoot formation from basal explants was achieved on MS medium supplemented with 30 g L^{-1} sucrose, 8 g L^{-1} agar and various treatments with cytokinins [6-benzylaminopurine (BA), 6-γ,γ-dimethylallylaminopurine (2iP), kinetin (Kin), thidiazuron (TDZ) and meta-topolin or N^6-(meta-hydroxybenzyil)adenine (MT)]. The highest shoot production efficiencies were obtained with 1.5 mg L^{-1} of BA, which rendered 10.5 shoots per explants. The *in vitro* rooting of generated shoot was achieved on MS basal medium with frequency ranging of 93 %, the survival of plants transferred to soil on the average was 53 %.

Keywords: *Agave cupreata*, cytokinins, micropropagation.

INTRODUCCIÓN

Para los pobladores de México desde tiempos remotos las especies del género *Agave* han sido importantes y se mantienen como una opción productiva interesante en diversas zonas áridas y semiáridas del país. Esto se debe a la amplia diversidad de usos que poseen estos vegetales, ya que son productores de alimento, de fibras naturales, de materia prima para elaborar bebidas alcohólicas y de materiales para la construcción, y por su importancia reciente como vegetales ornamentales (García-Mendoza, 1995). Por ello ha cobrado interés el desarrollo de tecnologías para facilitar su manejo y mejoramiento, como el cultivo y propagación masiva *in vitro* de metabolitos secundarios o el mejoramiento mediante la ingeniería genética.

Existen trabajos acerca del cultivo y propagación *in vitro* en especies de *Agave* productoras de fibras, como *A. fourcroydes* (Robert *et al.*, 1987), *A. cantala* y *A. sisalana* (Binh *et al.*, 1990; Nikam, 1997; Hazra *et al.*, 2002). También se han estudiado especies que se emplean para producir bebidas fermentadas y licores, como *A. angustifolia* (Enríquez-del-Valle *et al.*, 2005), *A. tequilana* (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006) y *A. salmiana* (Silos-Espino *et al.*, 2007), así como en la micropropagación de agaves amenazados de alto valor ornamental como *A. arizonica* (Powers y Backhaus, 1989) y *A. victoriae-reginae* (Martínez-Palacios *et al.*, 2003).

Tales especies fueron propagadas *in vitro* a partir del cultivo de meristemos basales o mediante embriogénesis somática u organogénesis indirecta, después de pasar por una etapa de tejido calloso. Pero aún existen numerosas especies importantes del género que no han sido estudiadas desde el punto de vista biotecnológico, a pesar del potencial de estas técnicas en el uso, conservación y mejoramiento de las mismas. En este trabajo se estableció un protocolo para la propagación masiva *in vitro* de *A. cupreata* que es una especie que se utiliza para producir mezcal en los estados de Guerrero y Oaxaca.

En este trabajo se estableció un protocolo para la propagación masiva *in vitro* de *A. cupreata* que es una especie que se utiliza para producir mezcal en los estados de Guerrero y Oaxaca.

Foto: I. A.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las semillas de *A. cupreata* Trel. & Berger, se desinfectaron mediante tres lavados por 10 min con detergente líquido (Dermoclean®) al 1 % en agua corriente, luego un lavado con etanol al 70 % durante 45 s, y después se sumergieron por 25 min en una solución de blanqueador comercial (Cloralex®) al 15 % (v/v). Finalmente se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril bajo condiciones de asepsia, y se inocularon en el medio de cultivo.

El medio basal que se utilizó fue el MS Murashige y Skoog, 1962), a pH 5.7 con 8 g L^{-1} de agar (Sigma-Aldrich) como gelificante. Los cultivos se mantuvieron a 25 ± 2 ° C bajo luz continua (54 mmol m^{-1} s^{-1}) por 30 a 45 d, hasta tener plántulas de 3 a 6 cm de altura. Este medio basal y condiciones de incubación se aplicaron en todos los experimentos posteriores. A partir de estas plántulas se tomaron los explantes que se utilizaron en los experimentos de multiplicación *in vitro*. Para esto, se eliminaron sus hojas y raíces, y la porción restante que contenía los tejidos meristemáticos se inoculó en medio basal adicionado con diversos tipos y concentraciones de citocininas con el fin de determinar el tratamiento hormonal más eficiente para estimular la generación de brotes múltiples en los explantes.

Las citocininas probadas fueron: 6-bencilaminopurina o benciladenina (BA), 6-γ,γ-dimetilalilaminopurina

(2iP), cinetina (Cin), tidiazurón (TDZ) y [N^6-(metahidroxibencil)adenina] o metatopolina (MT) (todas de la marca Phyto Technology Laboratories), en las concentraciones que se muestran en el Cuadro 1. Los cultivos se mantuvieron en las condiciones antes descritas y a los 90 d se registró el número de brotes generados en cada explante. Se utilizó un mínimo de diez explantes por tratamiento. Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias con prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los brotes generados en los medios de multiplicación con citocininas se separaron del explante original y se transfirieron a medio basal sin reguladores del crecimiento, para promover la formación del sistema radical. A los 30 d de incubación se registró el porcentaje de brotes enraizados, se eliminó el sello y se les aflojó la tapa para promover la adaptación paulatina de los brotes a las condiciones de humedad del medio externo. Después de 15 d en estas condiciones, los brotes se sacaron del medio de cultivo, se lavaron con agua corriente para eliminar los restos del mismo, se sembraron en una mezcla 1: 1 de arena y suelo comercial para macetas, y se transfirieron al invernadero.

La supervivencia en invernadero de las plántulas generadas *in vitro* se determinó entre los 30 y 45 d. Se consideró que la adaptación al suelo fue exitosa cuando la planta dio señales de reiniciar su crecimiento. Para la etapa de enraizamiento se evaluaron al menos 10 lotes de 10 brotes cada uno, mientras que para la adaptación y transferencia a suelo se usaron 10 lotes de seis plántulas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El porcentaje de contaminación de las semillas fue inferior a 20 %. El porcentaje de germinación *in vitro* fue de 68 %. De los 30 a los 45 d se tenían ya plántulas de 3 a 6 cm, las cuales sirvieron como fuente de explantes para los siguientes experimentos.

Los explantes basales provenientes de las plántulas germinadas *in vitro* generaron brotes múltiples en la mayoría de tratamientos. Se generaron brotes en todos los tratamientos con BA, 2iP, Cin y TDZ (Figura 1), pero no hubo respuesta a la MT. Los mejores tratamientos fueron 1.5 mg L^{-1} de BA, con un promedio de 10.5 brotes por explante; y 2.0 mg L^{-1} de 2iP, con 10.0 brotes por explante (Cuadro 1). Como los brotes más vigorosos se obtuvieron con BA, ésta se considera la citocinina más recomendable para la propagación masiva *in vitro* de *A. cupreata*.

En todos los estudios consultados acerca de la propagación *in vitro* de especies de *Agave* se utilizaron BA, 2iP o Cin, solas o combinadas con auxinas.

En cuanto a la eficiencia de los protocolos, Nikam (1997) reportó la generación de 5.7 brotes por explante en un tratamiento con 0.5 mg L^{-1} de Cin en *A. sisalana*. Santacruz-Ruvalcaba *et al.* (1999) obtuvieron 22 brotes por explante con 3 mg L^{-1} de BA en *A. parrasana* Berger, mientras que Martínez-Palacios *et al.* (2003) reportaron 2.2 brotes por explante en *A. victoria-reginae* cultivado con 1 mg L^{-1} de BA. Estos investigadores también usaron meristemos similares como explantes, y sus resultados confirman la respuesta heterogénea que ocurre entre las especies de *Agave*, como se observó en este trabajo. Valenzuela-Sánchez *et al.* (2006) reportaron promedios de hasta 19.5 brotes por explantes en *A. tequilana* con un sistema de organogénesis indirecta, sistema de regeneración que al igual que la embriogénesis somática puede ser más eficiente que la formación de

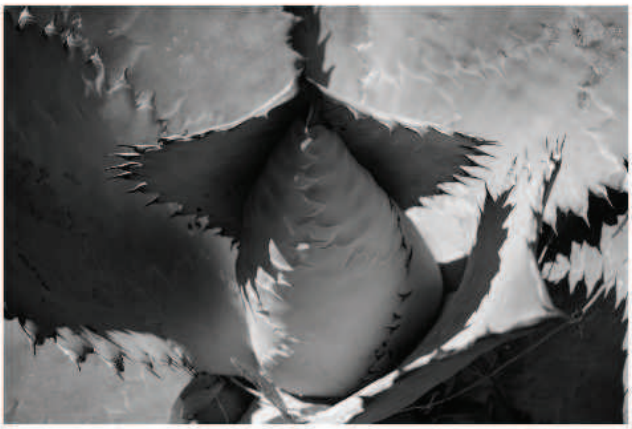

Foto: I. A.

Las plántulas pueden variar en función de las condiciones del hábitat natural para esta especie

Foto: I. A.

brotes a partir de tejidos meristemáticos. Sin embargo, el pasar por una fase de tejido calloso los hace proclives a variación somaclonal (Oliveira *et al.*, 1995), lo cual es indeseable cuando se busca propagar masivamente para conservar el acervo genético de los materiales originales. Por ello en este trabajo se seleccionaron tratamientos con bajos niveles de citocininas y sin auxinas, lo que permitió generar brotes sin la formación de tejido calloso en los explantes.

El enraizamiento de los brotes generados se logró en medio basal sin reguladores del crecimiento, con una eficiencia de 93 %. Aparentemente, las citocininas usadas para generar brotes no afectaron su capacidad de enraizamiento. Sin embargo los brotes generados con BA y transferidos a medio sin reguladores de crecimiento para su enraizamiento, siguieron generando más brotes al mismo tiempo que producían raíz. Esto indica que en esta especie la BA tiene una fuerte actividad residual, la cual no afecta la capacidad de enraizamiento. Los sistemas radicales generados en el medio sin reguladores del crecimiento fueron vigorosos (Figura 1).

Resultados similares se han reportado para *A. arizonica* (Powers Backhaus, 1989), *A. parrasana* (Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 1999) y *A. victoria-reginae* Martínez-Palacios *et al.*, 2003), que mostraron altas tasas de enraizamiento sin necesidad de auxinas. Solamente en *A. angustifolia* se ha recomendado el uso de ácido indolbutírico (AIB) para inducir el enraizamiento *in vitro* (Enríquez-del-Valle *et al.*, 2005), y en *A. salmiana* la auxina recomendada para el enraizamiento es el ácido indolacético (AIA) (Silos-Espino *et al.*, 2007). En cuanto a la supervivencia en invernadero de las plantas fue de 53 % (Figura 2 y Cuadro). El porcentaje de supervivencia tal vez se podría incrementar usando otros sustratos, ya que los requerimientos de las plántulas pueden variar en función de las condiciones del hábitat natural para esta especie. Todas las plantas que sobrevivieron al proceso de adaptación al medio externo en condiciones de invernadero, continúan vivas un año después, y muestran un crecimiento vigoroso *ex vitro*.

CONCLUSIONES

Se demostró que es posible propagar *in vitro* de manera eficiente a la especie *A. cupreata* para la que no existían antecedentes en este sentido. El protocolo desarrollado generó entre 0.2 y 10.5 brotes por explante en promedio; estas tasas de propagación se lograron con tratamientos con citocininas, y después de 90 d de incubación. Este protocolo tiene el potencial de generar 13,890 nuevas plantas a partir de un solo explante, en el lapso de un año (cuatro ciclos de cultivo). El método desarrollado puede aplicarse para la generación masiva de plantas para su aprovechamiento, y para disminuir así las presiones que la sobreexplotación ejerce sobre las poblaciones silvestres del agave.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Cuadro 1. Efecto del tipo y concentración de citocininas en la generación de brotes a partir de meristemos basales en *Agave cupreata* Trel. & Berger, a los 90 d de incubación.

Citocinina (mg L^{-1})					Brotes por explate
BA	2iP	Cin	TDZ	MT	*A. cupreata*
0.5	-	-	-	-	2.4 defghi
1.0	-	-	-	-	6.9 bcd
1.5	-	-	-	-	10.5 a
2.0	-	-	-	-	8.5 abc
3.0	-	-	-	-	1.6 ghi
-	0.5	-	-	-	2.5 defgh
-	1.0	-	-	-	3.2 bcd
-	1.5	-	-	-	5.1 bcd
-	2.0	-	-	-	10.0 ab
-	3.0	-	-	-	4.7 bcde
-	-	1.0	-	-	3.1 cdefgh
-	-	1.5	-	-	3.2 cdefg
-	-	2.0	-	-	4.0 cdef
-	-	3.0	-	-	4.7 bcde
-	-	-	0.1	-	1.7 efghi
-	-	-	0.2	-	8.4 abc
-	-	-	0.3	-	7.5 abcd
-	-	-	0.4	-	2.6 defgh
-	-	-	-	0.5	0.0 i
-	-	-	-	1.0	0.0 i
				1.5	0.2 hi
				2.0	0.0 i

BA = Benciladenina; 2iP = Dimetilalilaminopurina; Cin = Cinetina; TDZ = Tidiazurón; MT = Metatopolina. Medias con letras iguales dentro de la misma columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

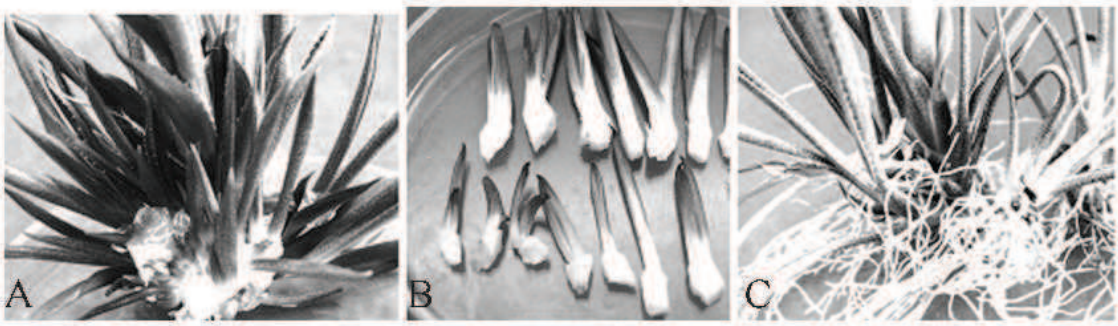

Figura 1. Generación de brotes en explantes basales cultivados en medio con citocininas (A), brotes separados del explante original antes de su transferencia a medio de enraizamiento (B) y brotes ya enraizados *in vitro*, listos para su transferencia a suelo (C) de *Agave cupreata*.

Figura 2. Plántulas generadas in vitro creciendo en invernadero, a cuatro meses de su transferencia a suelo de Agave cupreata.

Foto: I. A.

BIBLIOGRAFÍA

1. Binh. L.T.. Muoi. L.T.. Oanh. H.T.K., Thang, T.D.. Phong. D.T. 1990. Rapid propagation of agave by in vitro tissue culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 23: 67-70.

2. Enríquez del Valle, J.R., Carrillo-Castañeda. G.. Rodríguez de la O. J.L. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado in vitro de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28:175-178.

3. Garcia-Mendoza, A. 1995. Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México. En: Linares, E.; Dávila, P.; Chiang, F.; Bye, R.; Elias, T., eds. 4. Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. México, D.F.: UNAM: 51–75.

5. Hazra. K. S., Das, S.. Das. K. A. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 70:235-240.

6. Martinez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, M. P., Chávez, M. V. and Bye, R. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae- reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74:135–142.

7. Murashige, T., Skoog. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

8. Nikam, D. T. 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell,and Organ Culture*. 51:225-228.

9. Oliveira, S. A.; Machado, M. F. P. S.; Prioli, A. J. In vitro propagation of Cereus peruvianus Mill (Cactaceae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 31:47–50; 1995.

10. Powers, D.E., Backhaus, R.A. 1989. In vitro propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16:57-60.

11. Robert, M.L., Herrera, J.L., Contreras, F., Scorer, K.N. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroïdes*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 8:37-48.

12. Santacruz-Ruvalcaba, F.. Gutiérrez-Pulido, H. and Rodríguez-Garay, B. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 56:163–167.

13. Silos-Espino H., González-Cortés, N., Carrillo-López, A., Guevara-Lara, F., Valverde-González, M.E., Paredes-López, O. 2007. Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* "Gentry". *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 82:355-359.

14. Valenzuela-Sánchez, K.K., Juárez-Hernández, R.E., Cruz-Hernández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M.E., Paredes-López, O. 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 42:336–340