

**DETERMINACIÓN DE NIVELES DE NITRÓGENO Y CALCIO EN LA
MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS DE *Agave tequilana* WEBER
VARIEDAD AZUL**

**Martha Isabel Torres-Morán^{1*}, Ricardo Nuño-Romero²,
Fernando Santacruz-Ruvalcaba¹ y Andrés Rodríguez-García¹**

¹Departamento de Producción Agrícola, Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos, ²Departamento de Desarrollo Sustentable. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México. Km 15 carretera a Nogales C.P. 45110. Teléfono y Fax (01) 36-77-11-50 ext. 3141.

*Autor responsable: tmm08531@cucba.udg.mx

En la producción *in vitro*, la influencia del nitrógeno en las plantas es fundamental, puede mencionarse principalmente su importancia en la morfogénesis y diferenciación de los tejidos (formación de brotes, raíz, etc.) y su participación en los procesos fisiológicos que sustentan el desarrollo vegetativo de las plantas.

El crecimiento y la morfogénesis *in vitro*, están grandemente influenciados por la disponibilidad y la forma en que el nitrógeno está presente en los medios de cultivo. Por otra parte, el calcio es un elemento requerido para el funcionamiento normal de todas las membranas y es un mensajero secundario en las señales hormonales y de respuesta de la planta al medio ambiente. En su recién descubierta función como mensajero secundario, el calcio se enlaza con el calmodulin, una proteína encontrada en el citosol en las células vegetales y este complejo calcio-calmodulin regula muchos procesos metabólicos, principalmente relacionados con la actividad hormonal de giberelinas y ácido abscísico.

En el presente trabajo, se probaron varios niveles de nitrógeno y calcio en el medio de cultivo y se determinó la modificación de los mismos para mayor obtención de brotes en la micropropagación de agave.

Se eligieron dos grupos de brotes que provienen del establecimiento de hijuelos de rizoma (A4H3 y A10H2) colectados en un campo certificado por el Consejo Regulador del Tequila (CRT) como *Agave tequilana* Weber variedad azul. Fueron establecidos *in vitro* y se propagaron hasta obtener una producción de brotes suficiente para realizar el experimento con nitrógeno y calcio (aproximadamente 100 brotes de cada hijuelo).

Los medios basales de los que se partió para evaluar los diferentes niveles de N y Ca fueron el MS (Murashige y Skoog, 1962) y el SH (Schenk y Hildebrandt, 1971). La evaluación de los brotes en la fase *in vitro* comprendió un periodo de 30 días.

Para determinar las dosis de N y Ca se siguió la metodología de superficies de respuesta, de acuerdo a un arreglo rotacional central compuesto con 2 factores (N y Ca) y cinco niveles (-□, -1, 0, 1, □); en donde (0,0) es un punto central correspondiente a las cantidades de esos elementos reportadas en los medios de cultivo originales y cuatro puntos axiales (-□,0; 0,- □; 0, □; □,0), en donde □ = $F^{0.25}$ y F = número de tratamientos del factorial con los niveles -1 y 1.

Se utilizaron nueve tratamientos de nitrógeno y calcio en medio basal Murashigue y Skoog, 1962 (MS) y nueve en medio basal Schenk y Hildebrandt, 1971 (SH). Se utilizaron cuatro repeticiones de cada tratamiento tomando como unidad experimental un brote individual.

Se probó el ajuste de tres modelos cuadráticos obtenidos por el método stepwise para encontrar la combinación óptima de los elementos N y Ca (Cuadro 1).

Cuadro 1. Modelos de regresión ensayados para niveles de N y Ca

MODELO	DESCRIPCIÓN
$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_1^2 + \beta_4x_2^2 + \beta_5x_1x_2$	Modelo de dos variables independientes cuadrático con interacción
$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_1^2 + \beta_4x_2^2$	Modelo cuadrático para las dos variables independientes
$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_1^2$	Modelo cuadrático para una de las variables independientes

Resultados y discusión

En el Cuadro 2, se resume el ajuste realizado a cada uno de los modelos en donde se aprecia por la significancia del ajuste, que en el medio MS es más claro el efecto de N y Ca, mientras que en el medio SH no es así.

Lo anterior sugiere que en el medio SH no pueden ser fácilmente optimizados los niveles de los elementos mencionados, debido principalmente a la variación de los resultados en un mismo nivel de N y Ca, lo que incrementa la suma de cuadrados del error, provocando que algunos parámetros del modelo no sean significativos

Cuadro 2. Resumen de los modelos de regresión para la variable producción de brotes

MEDIO SH							
	Modelo (y=)	A10H2	p	R2	A4H3	p	R2
No. brotes	N,Ca,N ² ,Ca ²	**	0.0063	0.361548	*	0.0464	0.261048
	N,Ca,N ²	*	0.02164	0.25736	*	0.0244	0.251369
	N,Ca,N ² ,Ca ² ,Nca	*	0.01321	0.367871	NS	0.073	0.274365
MEDIO MS							
No. brotes	N,Ca,N ² ,Ca ²	**	0.0034	0.388907	**	0.0001	0.51412
	N,Ca,N ²	**	0.00681	0.312577	**	4E-05	0.509841
	N,Ca,N ² ,Ca ² ,Nca	**	0.00547	0.4093	**	0.0001	0.55282
** altamente significativo (P ≤ 0.01)			NS = No significativo				

En todos los casos para la variable número de brotes, el modelo cuadrático sin interacción (Nca), es adecuado para explicar el número de brotes en función del N y Ca utilizados, sin embargo, este modelo no resultó con ajuste altamente significativo para el clon A4H3 en el medio SH. En ningún caso, el modelo con interacción (Nca) superó significativamente al modelo sin interacción.

Los coeficientes de determinación múltiple (R^2) varían de 0.261 a 0.514 y son significativos ($p < 0.05$), aunque estos valores no son tan altos como es deseable, esto puede deberse a la variabilidad de la respuesta de los clones dentro de cada nivel ensayado; podría ensayarse otro tipo de superficie de respuesta para ajustar otros modelos o igualmente, buscar otro modelo mecanicista que explique el fenómeno, pero eso rebasa el objetivo del presente trabajo.

Tomando en cuenta que la única variable que no estuvo controlada dentro del trabajo de laboratorio fue el tamaño de corte de los brotes en cada resiembra, la variación total no explicada por los modelos es atribuible a ese hecho y a las diferencias genéticas entre los clones usados. Esto es concordante con lo expuesto por Pierik (1987) y George (1993) en relación a que la respuesta morfogénica de la planta depende, de la disponibilidad de nutrientes y de su constitución genética.

Determinación de niveles óptimos de N y Ca para número de brotes

Las cantidades de N y Ca para cada clon en cada medio de cultivo, se optimizaron derivando parcialmente las funciones respecto de N y Ca. Los valores obtenidos se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Dosis óptimas de N y Ca para producción de brotes de dos clones de A. tequilana en dos medios basales

Clon	Medio basal	Dosis óptima (mg/l)			
		Fuente	N	Fuente	Ca
A4H3	SH	KNO ₃	1735.0	CaCl ₂	232.2
		NH ₄ H ₂ PO ₄	208.3		
	MS	KNO ₃	2042.0	CaCl ₂	379.1
		NH ₄ NO ₃	1773.3		
A10H2	SH	KNO ₃	2115.5	CaCl ₂	172.3
		NH ₄ H ₂ PO ₄	253.8		
	MS	KNO ₃	1324.7	CaCl ₂	410.5
		NH ₄ NO ₃	1650.5		

Los niveles originales de los medios son:

MS - 1900 mg/l de KNO₃, 1650 mg/l de NH₄NO₃ y 440 mg/l de Ca Cl₂.

SH - 2500 mg/l KNO₃, 300 mg/l de NH₄H₂PO₄ y 200 mg/l de Ca Cl₂.