

Acondicionamiento y evaluación de tratamientos de desinfección para la micropropagación de *Sagittaria macrophylla* zucc. procedente de las Ciénegas del Rio Lerma

Martínez De la Cruz, Julio C.¹; Aguilar Morales, María A.^{2*}; De la Cruz Olvera, Armandina³; Laguna Cerda, Antonio⁴; Cruz Monterrosa, Rosy G.²; Díaz Ramírez, Mayra²; Jiménez Guzmán, Judith²; García Garibay, Mariano²; Miranda de la Lama, Genaro C.²; León Espinoza, Erika B.²; Fabela Morón, Miriam F.²; Rayas Amor, Adolfo A.^{2*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana, Biología Ambiental, División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Unidad Lerma. Lerma de Villada, estado de México. CP. 52006. ²Universidad Autónoma Metropolitana Departamento de Ciencias de la Alimentación. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Unidad Lerma. Lerma de Villada, estado de México. CP. 52006. ³Secretaría de Medio Ambiente. Metepec, Estado de México, Laboratorio de Biotecnología. Departamento de Producción de Planta. Dirección de Restauración y Fomento Forestal. Protectora de Bosques del Estado de México. ⁴Universidad Autónoma del Estado de México Facultad de Ciencias Agrícolas, Carretera Toluca- Ixtlahuaca Kilómetro 15.5, El Cerrillo El Cerrillo Piedras Blancas, 50200 Toluca de Lerdo, México.

*Autor de correspondencia: ascencali@yahoo.com.mx; a.rayas@correo.ler.uam.mx;

ABSTRACT

Objetivo: Evaluar el método de acondicionamiento y desinfección de *Sagittaria macrophylla* zucc. (Alismataceae) de la Ciénega de Lerma, para su propagación y conservación.

Diseño/metodología/ aproximación: Se estableció en invernadero un diseño completamente al azar con tres repeticiones para evaluar dos tipos de sustrato para *S. macrophylla*, se evaluó el número y longitud de brotes sanos. El primer sustrato consistió en una mezcla de suelo y agrolita (2:1) (S1); el segundo sustrato se consideró el control ya que consistió en sedimentos de la Ciénega del Rio Lerma (S2). Se evaluó un método de desinfección donde los tratamientos consistieron en: lavados + etanol al 70% + cloro comercial (T1) y lavados + microdin-jabón líquido + etanol al 70% + cloro comercial (T2). Las condiciones de fotoperiodo (luz y oscuridad) representaron los bloques del diseño experimental.

Resultados: En el experimento de tipo de sustrato se obtuvieron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre tratamientos, donde S1 mostro 2.4 ± 0.24 brotes en promedio con longitud de 2.5 cm en 30 d y con tendencia a incrementar. El experimento de desinfección mostró diferencias estadísticas ($P < 0.05$); sin embargo, el fotoperiodo no presento diferencias ($P > 0.05$). El T2 presento el menor porcentaje de contaminación 31.25%.

Limitaciones del estudio/implicaciones: los resultados presentados son avances de un experimento a largo plazo.

Hallazgos/conclusiones: El acondicionamiento de plantas madre de *S. macrophylla* es favorable en condiciones de invernadero en un sustrato compuesto por suelo negro y agrolita 2:1 permitiendo brotes sanos. El mejor método de desinfección consistió en un enjuague a chorro de agua con jabón en polvo, 30 min con 100 mL de agua destilada más una gota de microdin comercial y dos de jabón líquido, 2 min en agitación constante en etanol al 70% y 20 min en cloro comercial (6%) al 30% v/v, utilizando como explantes las yemas axilares de los tubérculos sin importar el fotoperiodo en el cuarto de incubación.



Palabras clave: papa de agua, peligro de extinción, sustrato, desinfección, cultivo *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

Las ciénegas de Lerma en el Estado de México han provisto de diferentes servicios a la población, mismas que por un lapso permitieron el desarrollo de algunas prácticas agropecuarias ribereñas importantes para el sustento de la comunidad aledaña (Albores, 2002). La biodiversidad de las lagunas de la Ciénega de Lerma se caracteriza por su flora y fauna muy peculiar. Gran parte de la variedad de especies que componen la vegetación de las lagunas son plantas acuáticas endémicas de México. Algunas de ellas se encuentran en categoría de riesgo derivado de la pérdida y deterioro del hábitat (Sánchez-Reyes *et al.*, 2012; Zepeda-Gómez *et al.*, 2012 a y b; Zepeda *et al.*, 2014). La especie *Sagittaria macrophylla* zucc. (Acuitlapalli) (Figura 1) en náhuatl significa atl=agua, cuiltlac=planta, tierra y palli=barro negro (papa de agua), es una de las 19 especies acuáticas de la familia Alismastaceae que habitan en México, y es una planta emergente endémica que crece en zonas poco profundas como charcas, zanjas y márgenes de cuerpos de agua dulce (Zepeda y Lot, 2005). Esta especie es conocida en México como "cola de pato", "cucharilla", "flecha de agua" y "hoja de flecha". Crece entre los 2100 y los 2700 m de altitud, principalmente en la Ciudad de México y los estados de Hidalgo, Jalisco, México y Michoacán (Miranda, 2019).

Está catalogada por la Norma Oficial Mexicana-059-SE-MARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) como especie ame-

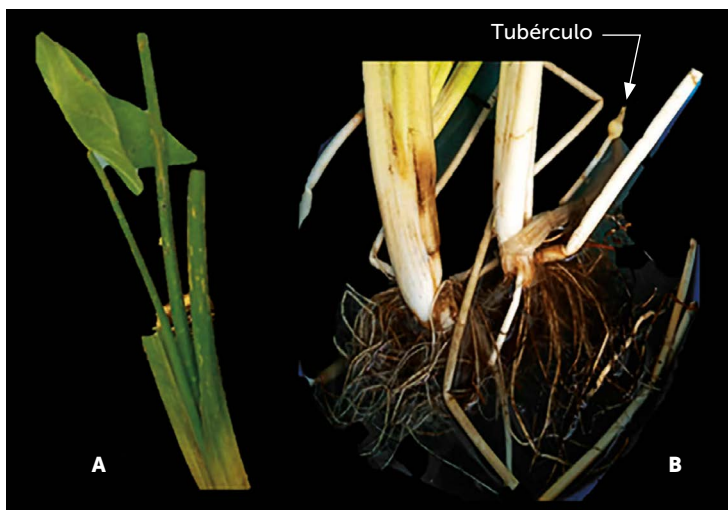


Figura 1. *Sagittaria macrophylla* zucc. (A) parte aérea de la planta tallo y hoja, (B) parte baja de la planta raíces, tubérculos y estolones.

nazada (A), debido a la reducción y contaminación de su hábitat. De acuerdo con González *et al.* (2011) algunos pobladores de San Pedro Tultepec de Quiroga, aún se adentran a la laguna de Chimaliapan y la recolectan para autoconsumo o comercialización ya que esta especie forma parte de la gastronomía de las poblaciones ribereñas pese a que la laguna se encuentre contaminada (Viesca *et al.*, 2011). Este tubérculo es relevante ya que forma parte de la dieta de algunas especies animales que habitan dentro de las lagunas como es el caso del pato mexicano (Anais dazi) en la laguna de Chimaliapan (Zepeda-Gómez *et al.*, 2012 a y b). Una de las formas de conservar especies que se encuentran en alguna categoría de riesgo es mediante la propagación *in vitro*, de esta manera se puede preservar y multiplicar el número de individuos de una especie en particular en un área reducida para que después se puedan reproducir naturalmente y mitigar la pérdida de cierta especie. En este tenor, se han logrado desarrollar protocolos de propagación mediante esta técnica en especies que se encuentran en alguna categoría de riesgo, entre las familias más estudiadas están Orchidaceae (Menchaca *et al.*, 2012; Azofeifa *et al.*, 2019; Dolce *et al.*, 2020), Cactaceae (Téllez-Román *et al.*, 2017; Ramírez-González *et al.*, 2019), Nolinaceae (Flores *et al.*, 2019; Reyes-Silva *et al.*, 2013; Martínez-Peña *et al.*, 2012). Se evaluó un método de acondicionamiento y desinfección de *Sagittaria macrophylla* zucc. (Alismataceae) de la Ciénega de Lerma, para su propagación y conservación en condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron cuatro plantas completas (planta madre) donadas por los comuneros de la "Laguna Chimaliapan" y sustrato de la laguna. Las plantas se transportaron al invernadero de biotecnología forestal conjunto SEDAGRO Metepec Estado de México en 20 L de agua para su posterior manejo. En un invernadero, las plantas se colocaron en tinas de aproximadamente 1 × 0.5 m.

Acondicionamiento de las plantas

Para evaluar el acondicionamiento de las plantas se evaluaron dos tipos de sustrato, el primero consistió en una mezcla de suelo negro y agrolita en proporción de 2:1, respectivamente (S1); el segundo sustrato se consideró el control ya que consistió en sedimentos de la Ciénega del Río Lerma (S2), posteriormente se les agregó agua hasta que los tubérculos quedaran inundados, se dejaron en el invernadero

durante 30 d con el objetivo de obtener nuevos brotes.

Desinfección del material vegetal

Se evaluó un método de desinfección para obtener material vegetal sano y micropropagarlo, para tal evaluación se estableció un diseño de bloques completos al azar en el laboratorio de biotecnología forestal en donde se evaluaron dos tratamientos. El primero (T1) consistió en lavados + etanol al 70% + cloro comercial, y el segundo (T2) consistió en lavados + microdin (plata coloidal) + jabón líquido + etanol al 70% + cloro comercial (Cuadro 1) con ocho repeticiones cada uno. Las condiciones de luz, oscuridad (fotoperiodo) representaron los bloques del diseño experimental.

Las yemas axilares de los tubérculos (explantes) fueron sembrados en condiciones asépticas en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) MS al 100% de la concentración de sus sales minerales, adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 7 g de agar bacteriológico. Se ajustó pH a 5.7±0.1 y se esterilizó durante 15 min a una temperatura de 120 °C, para posteriormente evaluar el porcentaje de contaminación del material vegetal. Las siembras se colocaron en el área de incubación donde se les proporciono un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad colocándolos en una caja completamente cerrada en el mismo cuarto de incubación a temperatura de 24-26 °C.

Análisis estadístico

Los variables para evaluar el acondicionamiento de las plantas se estableció un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Las variables respuesta fueron el número y longitud de brotes dependiendo del sustrato empleado (S1 o S2). El modelo general lineal fue:

$$Y_i = \mu + T_i + e_j$$

en donde, Y_i fue la variable respuesta del i -ésimo tratamiento, μ la media, T_i el i -ésimo tratamiento y e_j el error experimental.

Para evaluar la desinfección de las plantas se estableció un diseño de bloques completos al azar con ocho repeticiones. Las variables que se evaluaron fueron el porcentaje de contaminación, contaminación por hongos (el explante es cubierto por un cuerpo algodonoso), bacterias (aparición de un cuerpo lechoso de olor fétido cubriendo el explante) y el porcentaje de oxidación del material (más del 50% del explante toma un color marrón-café). El modelo general lineal fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + e_{ij}$$

en donde, Y_{ij} fue la variable respuesta en el i -ésimo tratamiento y en el j -ésimo bloque, μ la media, T_i el i -ésimo tratamiento, B_j el j -ésimo bloque y e_{ij} el error experimental. Se consideraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos cuando ($P < 0.05$), posteriormente se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey (Steel y Torrie, 1980) empleando The SAS System for Windows 9.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plantas madre en el invernadero comenzaron a presentar nuevos brotes a los 30 d después de haber sido colocadas en los sustratos evaluados, en ambos sustratos se observaron brotes. Se presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) entre S1 y S2 (Figura 3). Aunque en S2 se presentaron en promedio 2.58 brotes, los brotes más jóvenes se vieron afectados por la necrosis causada por el tipo de sustrato (Figura 2). No se presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) para la longitud de brotes.

Cuadro 1. Tratamientos de desinfección de material vegetativo de *Sagittaria macrophylla* zucc. para ser evaluadas en cultivo *in vitro*.

Tratamiento 1	Tratamiento 2
<ul style="list-style-type: none"> Se enjuagó el tubérculo a chorro de agua con jabón en polvo y cepillo de dientes para eliminar el lodo Se dejó por 2 min en agitación constante en etanol al 70% y se enjuagó tres veces con agua destilada. Después se mantuvo en agitación constante por 15 min en cloro comercial (6%) al 30% v/v y enjuagó tres veces con agua destilada. Para finalizar, en campana de flujo laminar se lavaron cinco veces con agua destilada esterilizada. 	<ul style="list-style-type: none"> Se enjuagó el tubérculo a chorro de agua con jabón en polvo y cepillo de dientes para eliminar el lodo. Por 30 min, se mantuvo en agitación constante, con 100 mL de agua destilada más una gota de microdin comercial y dos de jabón líquido, al finalizar se enjuago con agua destilada tres veces. A continuación, se dejó por 2 min en agitación constante en etanol al 70% y se enjuago tres veces con agua destilada. Se dejó en agitación constante por 20 min en cloro comercial (6%) al 30% v/v y enjuago tres veces con agua destilada. En campana de flujo laminar, se hicieron tres lavados con agua destilada esterilizada.

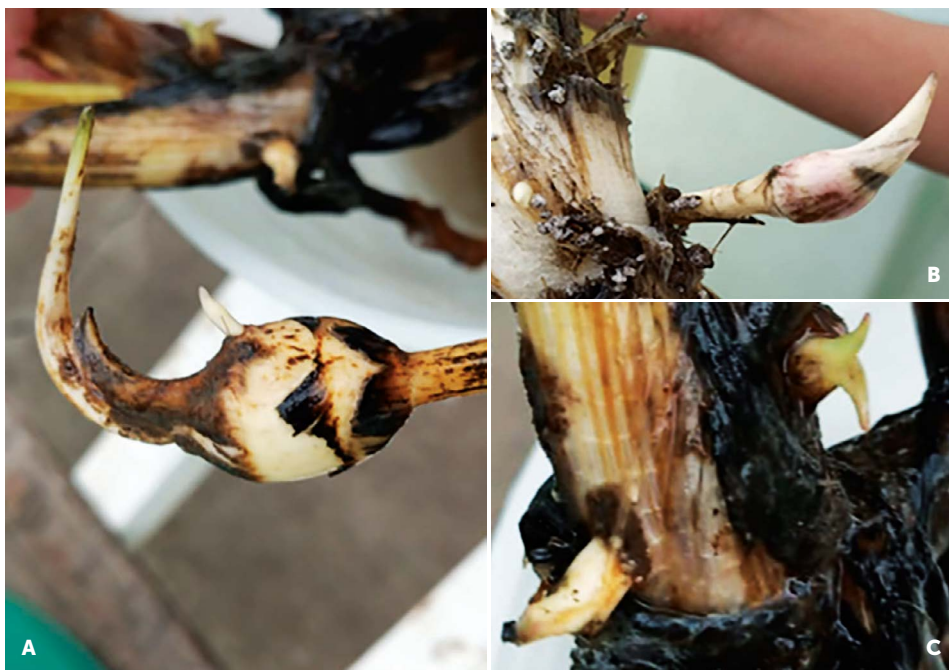


Figura 2. Brotes de *Sagittaria macrophylla* zucc después de 30 días establecidas bajo condiciones de invernadero. (A) Brote originado de un rizoma, (B) Brote en S1 (suelo negro y agrolita 2:1). C. Brote en S2 (sustrato original de Laguna Chimaliapan).

Los brotes en S1 compuesto por suelo negro más agrolita, registró 2.4 ± 0.24 brotes en promedio (Figura 3) y se observó una coloración blanquecina en éstos (Figura 2). La longitud de los brotes en este tratamiento incremento 0.38 cm en 30 d. Los brotes en S2 (compuesto por sedimento del sitio de recolecta de la planta) presentaron reducción en la longitud del brote (0.23 cm) desde su emergencia conforme los días transcurrieron.

Se resalta que para *S. macrophylla* solo se encuentran investigaciones de propagación mediante el uso de sustratos bajo condiciones ambientales de invernadero (asexual), en este sentido, Miranda (2019) reporto que mediante la mezcla de 70% de composta elaborada con *Eichhornia crassipes* y 30% de grava volcánica se logran obtener hasta tres brotes por planta en 45 d, resultados que son similares con los obtenidos en el presente estudio. Sánchez-Reyes et al. (2012), reportaron que plantas de *S. macrophylla* producen hojas con láminas de mayor superficie cuando son inundadas 5 cm por encima del sedimento.

Desinfección de material para el cultivo in vitro

Respecto al porcentaje de contaminación

se presentaron diferencias estadísticas ($P < 0.0001$) entre tratamientos de desinfección, presentando mayor contaminación el T1 con 93.75%, y menor en T2 (31.25%). En ambos tratamientos se presentó la contaminación por hongos y bacterias, siendo más notable la contaminación por bacteria (Cuadro 2), los porcentajes de contaminación en T2 fueron de 0% para hongo y 31.25% en bacteria, presentando los menores valores. Respecto al porcentaje de oxidación no se presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre tratamientos de desinfección, el T2 presento menor oxidación 19% que T1 (Cuadro 2).

Respecto al fotoperiodo en el cuarto de incubación, no se presentaron diferencias estadísticas respecto al porcentaje de contaminación y al porcentaje de contaminación por bacteria (Cuadro 2). De acuerdo con la revisión de literatura científica, no existen investigaciones de cultivo *in vitro* en *Sagittaria macrophylla*, los resultados obtenidos en el presente trabajo son alentadores para investigar y evaluar su multiplicación, enraizamiento y aclimatación, similar al trabajo reportado para *Sagittaria latifolia* (Hoang, 2016) donde se evaluó el método de propagación *in vitro* mediante la multiplicación de tubérculos obteniendo de 2 a 3 brotes por explante.

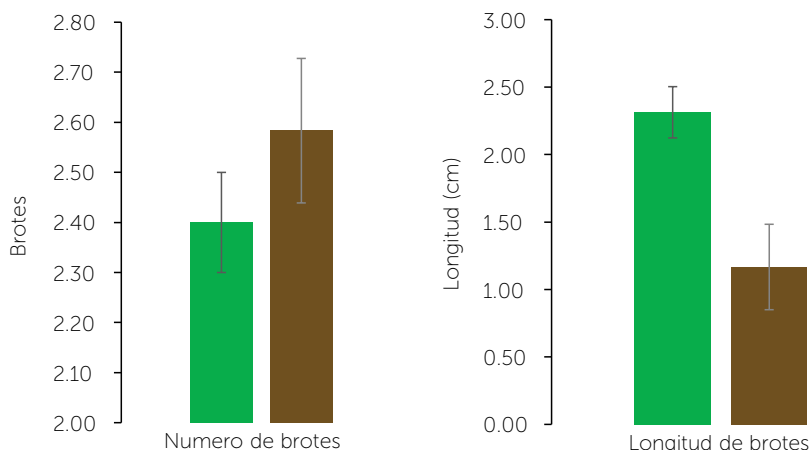


Figura 3. Promedio del número y longitud de los brotes a partir de plantas madre de *Sagittaria macrophylla* zucc. en invernadero durante 30 días. S1, barra verde y S2, barra café.

CONCLUSIONES

El acondicionamiento de plantas madre de *S. macrophylla* es favorable en condiciones de invernadero en un sustrato compuesto por suelo negro y agrolita 2:1 cuando este es inundado con 5 cm de agua. El tratamiento que permite obtener hasta 2.58 brotes y sanos por planta para ser cultivados *in vitro*, fue desinfección enjuague a chorro de agua con jabón en polvo, 30 min con 100 mL de agua destilada más una gota de microdín comercial y dos de jabón líquido, 2 min en agitación constante en etanol al 70% y 20 min en cloro comercial (6%) al 30% v/v, sin tener un efecto del fotoperiodo en el cuarto de incubación.

AGRADECIMIENTOS

A los comuneros de la laguna de Chimaliapan por donar las plantas madre de *Sagittaria macrophylla*. A la Protectora de Bosques del Estado de México PROBOSQUE y al Departamento de Ciencias de la Alimentación de la UAM Unidad Lerma por el apoyo brindado para la realización de la investigación para fortalecer los procesos biotecnológicos en cultivos *in vitro* para proteger y propagar especies en peligro de extinción de la región mexiquense.

LITERATURA CITADA

Albore, B. (2002). Apuntes sobre la agricultura maicera de humedad y temporal en San Mateo Atenco, Estado de México. CIENCIA ergo-sum. Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva 9 (3).

Azofeifa, J., Rivera, G., Paniagua, A., Cordero, R. y Salas, E. (2019). Efecto de la desinfección de segmentos nodales sobre el rendimiento morfogénico de vitroplantas de *Vanilla planifolia* Andrews. Agronomía Mesoamericana 30(1):33-49.

Dolce N.R., Medina R.D., Terada G., González-Arno M.T., Flachsland E.A. (2020). In Vitro Propagation and Germplasm Conservation of Wild Orchids from South America. In: Khasim S., Hegde S., González-Arno M., Thammasiri K. (eds) Orchid Biology: Recent Trends & Challenges. Springer, Singapore.

Flores, A., Romero-Sánchez, M.E., Pérez-Miranda, R. y Pineda-Ojeda, T. (2019). *Nolina parviflora*, seed disinfection and its implication in conservation. Mitigación del Daño Ambiental Agroalimentario y Forestal de México 5 (6):109-121.

González, F. C. V., Contreras, A. T. R., Somera, J. L. F., Mendoza, M. G., Salazar, B. Q. (2011). El impacto de la desecación de la laguna de Lerma en la gastronomía lacustre de San Pedro Tultepec de Quiroga, Estado de México. El Periplo Sustentable: revista de turismo, desarrollo y competitividad (21):101-138.

Cuadro 2. Promedios (n=16) de porcentajes de contaminación general, hongo, bacteria y oxidación de *Sagittaria macrophylla* zucc para el establecimiento *in vitro*.

	Contaminación %	Hongos %	Bacterias %	Oxidación %
Luz				
T1	93 ^{aA}	12 ^a	81 ^a	25 ^{aA}
T2	31 ^{bB}	0 ^b	31 ^b	19 ^{bA}
Oscuridad				
T1	62 ^{aA}	12 ^a	50 ^a	44 ^{aA}
T2	62 ^{aA}	0 ^b	62 ^a	0 ^{bB}
E.E.M.	6	7	9	10
valor-p para:				
tratamientos	***	*	***	*
fotoperiodo	*	NS	NS	***

Letras minúsculas y mayúsculas diferentes entre filas difieren entre tratamientos y bloques, respectivamente, *:P<0.05, ***: P<0.001. NS: no significativo (P>0.05). E.E.M.: Error estándar de la media.

Hoang, H. N. (2016). In vitro physiology of recalcitrant tissue cultured plants in the Nymphaeaceae, Alismataceae, and Orchidaceae. Ed. ProQuest LLC, 89-134.

Martínez-Peña, M., Díaz-Espinosa, A., y Vargas, O. (2012). Protocolo de propagación de plantas hidrófilas y manejo de viveros para la rehabilitación ecológica de los parques ecológicos distritales de humedal. Grupo de Restauración ecológica de la Universidad Nacional de Colombia y Secretaría Distrital de Ambiente. Bogotá, DC, Colombia.

Menchaca García, Rebeca Alicia, Lozano Rodríguez, Miguel Ángel, & Sánchez Morales, Lorena. (2012). Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. Revista mexicana de ciencias forestales 3(13):09-16.

Miranda, L.G. (2019). Propagación de *Sagittaria macrophylla* zucc. (ALISMATACEAE) planta acuática en peligro de extinción, con abonos orgánicos elaborados a base de lirio acuático. Tesis de grado en Maestro en Manejo de Recursos Naturales. Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma de Morelos.

Murashige, T. y Skoog, F. (1992). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, Copenhagen 15:473-497.

Ramírez-González, G., Rodríguez-De la O, J.L., Martínez-Solís, J., y Colinas-León, M.T. (2019). Germination and growth ex vitro and *in vitro* of five species of cacti of the genus Mammillaria. Polibotanica 48: 99-110.

SEMARNAT-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección Ambiental-Especies nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de Especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 30 diciembre. México.

Sánchez-Reyes, V., Zepeda, C.G., Manjarrez, S, F. Javier, & White Olascoaga, L. (2012). Efecto del nivel de agua sobre el tamaño y biomasa foliar de *Sagittaria macrophylla* (Alismataceae). Interciencia 37(10),775-781.

- Téllez-Román, J., López-Peralta, M.C.G., Hernández-Meneses, E., Estrada, L. A. A., Zavaleta, H.A.M., y Livera, M.M. (2017). Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber. Revista mexicana de ciencias agrícolas 8(4), 863-876.
- Viesca, G. F. C., Flores, S. J. L., Romero, C. A. T., Garduño, M. M. y Quintero, S. B. (2011). El impacto de la desecación de la laguna de Lerma en la gastronomía lacustre de San Pedro Tultepec de Quiroga, Estado de México. El Periplo Sustentable 21: 101-138.
- Zepeda, C. y Lot, A. (2005). Distribución y uso tradicional de *Sagittaria macrophylla* Zucc. y *S. latifolia* Willd. en el Estado de México, Ciencia ErgoSum 12: 282-290.
- Zepeda-Gómez, C., Lot-Helgueras, A., Nemiga, X. A. y Madrigal-Uribe, D. (2012) a. Floristics and diversity of the Lerma river wetlands in the State of Mexico. Acta botánica mexicana (98):23-43.
- Zepeda-Gómez, C., Lot-Helgueras, A., Nemiga, X. A. y Madrigal-Uribe, D (2012) b. Análisis del cambio del uso del suelo en las Ciénegas de Lerma (1973-2008) y su impacto en la vegetación acuática. Investigaciones geográficas 78:48-61.
- Zepeda, C., Lot, A., Nemiga, X. A. y Manjarrez, J. (2014). Banco de semillas y vegetación establecida en los últimos remanentes de los humedales de la Meseta Central Mexicana: las ciénegas de Lerma. Revista de Biología Tropical. 62(2): 455-472.

