



Artículo Científico

Establecimiento de un protocolo eficiente de desinfección *in vitro* en semillas de siete especies de *Agave* spp.

María Guadalupe Aguilar-Rito, Amaury Martín Arzate-Fernández*, Hilda Guadalupe García-Núñez, Tomás Héctor Norman-Mondragón, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km. 11.5. Campus Universitario “El Cerrillo”, C.P. 50200, Toluca, Estado de México, México.

*Autor de
correspondencia:
Amaury Martín Arzate-
Fernández
amaury1963@yahoo.com.mx

Sección:
Edición periódica

Recibido:
02 Octubre, 2023

Aceptado:
29 Noviembre, 2023

Publicado:
20 Diciembre, 2023

Cita:
Aguilar-Rito MG, Arzate-
Fernández AM, García-
Núñez HG and Norman-
Mondragón. 2024.

Establecimiento de un
protocolo eficiente de
desinfección *in vitro* en
semillas de siete especies
de *Agave* spp.

Revista Mexicana de
Fitopatología 42(1): 5.
<https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2310-1>



RESUMEN

Objetivo/Antecedentes. La desinfección de las semillas de *Agave* es un paso crucial en el cultivo *in vitro* para prevenir la contaminación, la cual puede ser causada por microorganismos como bacterias, hongos y virus que pueden afectar el crecimiento de las plántulas y reducir la tasa de germinación de las semillas. Por lo tanto, la desinfección adecuada de las semillas es esencial para garantizar un crecimiento vegetal vigoroso y saludable. El objetivo principal de esta investigación fue: evaluar 12 tratamientos para generar un protocolo eficiente de desinfección *in vitro* en semillas de seis especies de *Agave* mezcalero y un pulquero con desinfectantes y combinaciones diferentes.

Materiales y Métodos. Los desinfectantes utilizados fueron; Peróxido de Hidrógeno al 3 % por 24 h, Hipoclorito de Sodio comercial al 5 % (v/v) por 5 min, Hipoclorito de Calcio al 8 % (p/v) por 15 min, Sulfato de Cobre (PENTAMAX®) al 30 % (v/v) por 10 min, Cloruro de Mercurio II al 0.1 % (p/v) por 10 min.

Resultados. Los microorganismos contaminantes identificados fueron cuatro géneros de hongos: *Monilinia* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., y *Alternaria alternata*, una bacteria; *Bacillus* sp., y una levadura, *Schizosaccharomyces* sp.

Conclusión. El mejor tratamiento para la desinfección de las semillas fue Peróxido de Hidrógeno al 3 % por 24 h en combinación con Sulfato de Cobre al 30 % (v/v) por 10 min y Cloruro de Mercurio II al 0.1 % (p/v) por 10 min, obteniendo un 100 % de desinfección y logrando que germinaran todas las especies.

Palabras clave: Hongos, bacterias, métodos de desinfección, contaminación, germinación.

INTRODUCCIÓN

El género *Agave* es uno de los más representativos de México, con alrededor de 211 especies, de las cuales 159 tienen presencia en nuestro territorio, es decir, 75.3 % del total (García *et al.*, 2019). De ellas se obtienen diversos productos como alimentos, bebidas y fibras, entre otros (García, 2007). Sus usos en México están ligados al desarrollo económico, social, cultural y ecológico de numerosas poblaciones. En las últimas décadas, el *Agave* ha tenido un creciente auge social y económico por ser utilizado como materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas fermentadas y destiladas como el pulque, el mezcal y el tequila. En México, se recolectan varias especies de agave silvestre para destilar mezcal entre las cuales destacan *A. marmorata*, *A. karwinskii*, *A. potatorum*, *A. angustifolia*, *A. cupreata*, *A. horrida* y para la elaboración del pulque se recolecta una sola especie, *A. salmiana*. De acuerdo a la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y Recursos Naturales (IUCN) y la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) el *Agave* se ha vuelto presa de sobre-colecta a través del saqueo ilegal. La falta de propagación sexual han reducido las poblaciones silvestres y amenazan la variabilidad y estructura genética en los cultivares, además que la inflorescencia es removida usualmente para asegurar la acumulación de azúcares en la piña, impidiendo eventualmente la formación de semillas (Peña *et al.* 2006), lo que confirma la necesidad de preservar el germoplasma de estas especies en peligro de extinción y amenazadas a partir de semillas, mediante estrategias basadas en el desarrollo y optimización de protocolos para desinfección y propagación *in vitro*.

La desinfección de las semillas de agave es un paso crucial en el cultivo *in vitro*, ya que el éxito de los sistemas de propagación depende en gran medida del control y prevención de la contaminación. Los fitopatógenos provocan pérdidas cuantiosas de material vegetal en los procesos productivos o de investigación.

El propósito de desinfectar la semilla es erradicar microorganismos contaminantes presentes en la cubierta de la semilla y embrión, así las plantas que se obtengan estarán libres de bacterias y hongos asociados a las semillas. Además de prevenir la contaminación y las enfermedades, la desinfección de las semillas de *Agave* también puede mejorar las tasas de germinación, la cual es esencial para el éxito del cultivo *in vitro* de *Agave*, ya que una tasa de germinación baja puede afectar la eficiencia y productividad del proceso de cultivo *in vitro* (Zurita *et al.*, 2014; Flores *et al.*, 2019) Por lo tanto, es importante seguir los procedimientos de desinfección adecuados para garantizar el éxito del cultivo logrando mejorar la calidad, sanidad, rendimiento y conservación del germoplasma.

Actualmente, se han reportado diversos protocolos de desinfección de semillas en especies como *A. victoria reginae* (Domínguez *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*,

2008), *A. fourcroydes* (Monja, 2013), *A. angustifolia* (Arzate *et al.*, 2016), *A. marmorata* (Álvarez *et al.*, 2020) y *A. tequilana* (Delgado *et al.*, 2021), en los cuales la mayoría de los autores coinciden en el uso de Etanol e Hipoclorito de Sodio y Calcio. Sin embargo, en *Agave* no se ha reportado el uso de Cloruro de Mercurio ($HgCl_2$), Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) y fungicidas, así como la tasa de contaminación y los microrganismos contaminantes encontrados los cuales en grandes porcentajes encarecen la producción, por lo que, al contar con un protocolo eficiente de desinfección puede ayudar a reducir estos costos.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar 12 tratamientos (Cuadro 2) para generar un protocolo eficiente de desinfección *in vitro* en semillas de seis especies de *Agave* mezcalero *A. marmorata*, *A. karwinskii*, *A. potatorum*, *A. angustifolia*, *A. cupreata*, *A. horrida* y un pulquero *A. salmiana*, utilizando cinco desinfectantes que permitan una amplia desinfección: Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2), Hipoclorito de Sodio comercial (NaClO), Hipoclorito de Calcio $Ca(ClO)_2$, Sulfato de Cobre (PENTAMAX®), Cloruro de Mercurio II ($HgCl_2$) y Etanol (C_2H_6O).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, ubicado en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento de la Facultad de Ciencias Agrícolas, de la Universidad Autónoma del Estado de México, Campus Universitario “El Cerrillo”, Toluca, Estado de México.

Material biológico. Se utilizaron semillas maduras de siete especies de *Agave*, colectadas en diferentes Estados de la República Mexicana en un periodo de 1 a 7 años, conservadas en un banco de germoplasma durante su almacenamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Especies de *Agave* y datos de colecta de las semillas de agave.

Especie	Lugar de colecta	Fecha
<i>Agave horrida</i>	Ocuilan, México	2015
<i>Agave salmiana</i>	Acambay, México	2015
<i>Agave karwinskii</i>	Oaxaca, México	2017
<i>Agave potatorum</i>	Oaxaca, México	2017
<i>Agave marmorata</i>	Oaxaca, México	2017
<i>Agave angustifolia</i>	Zacualpan, México	2019
<i>Agave cupreata</i>	Puebla, México	2021

Desinfección del material biológico. Se evaluaron 12 tratamientos con soluciones desinfectantes y combinaciones diferentes (Cuadro 2) más un testigo (T0), seleccionados con base a los reportes obtenidos en la desinfección de semillas de otros géneros, los cuales presentaron resultados aceptables para desinfección (Flores *et al.*, 2008; Billard *et al.*, 2014; Tamayo *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2020; Zúñiga y Beauregard, 2020). Los desinfectantes utilizados fueron; Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 3 % por 24 h, Hipoclorito de Sodio comercial (Cloralex® al 4 %) (Na-ClO) concentración final de 5 % v/v) por 5 min, Hipoclorito de Calcio $Ca(ClO)_2$ al 8 % (p/v) por 15 min, Sulfato de Cobre nombre comercial PENTAMAX® al 30 % (v/v) por 10 min, Cloruro de Mercurio II ($HgCl_2$) al 0.1 % (p/v) por 10 min. Se evaluaron los 12 tratamientos con 10 semillas por tratamiento (cada semilla se consideró como una unidad experimental) y para cada tratamiento se consideraron tres repeticiones, evaluándose un total de 390 semillas por especie (considerándose un control). Se monitoreo el experimento cada semana, durante un período de 30 días.

Inicialmente las semillas se colocaron en tubos Falcón estériles con capacidad de 50 mL y fueron lavadas con 15 mL de agua de ósmosis estéril más 1 mL de jabón comercial (Axión®) y dos gotas de Tween 20® por 15 minutos manteniéndolas en agitación; pasado el tiempo se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Seguidamente, se sumergieron en 15 mL de etanol al 70% (v/v) por un minuto y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se aplicaron los

Cuadro 2. Tratamientos de desinfección evaluados en siete especies de *Agave*.

Tratamiento	Disinfectantes				
	Sulfato de Cobre 30 % v/v	$HgCl_2$ al 0.1 % p/v	$Ca(ClO)_2$ al 8 % p/v	NaClO al 5 % v/v	H_2O_2 al 3 %
0	*Control treatment				
1				15 min	
2					5 min
3			15 min	5 min	
4					24 h
5	10 min		15 min		
6	10 min			5 min	
7	10 min		15 min	5 min	
8	10 min				24 h
9	10 min	10 min	15 min		
10	10 min	10 min		5 min	
11	10 min	10 min	15 min	5 min	
12	10 min	10 min			24 h

Sulfato de Cobre (PENTAMAX®); $HgCl_2$ = Cloruro de Mercurio II; $Ca(ClO)_2$ = Hipoclorito de Calcio; NaClO = Hipoclorito de Sodio; H_2O_2 = Peróxido de Hidrógeno. *Testigo (Sin ningún desinfectante).

tratamientos de desinfección, las semillas se mantuvieron en agitación constante en todos los tratamientos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril después del tiempo de aplicación de cada desinfectante para eliminar los residuos de los desinfectantes, a excepción de los tratamientos con H_2O_2 . Todo se realizó en condiciones de asepsia, dentro de una campana de flujo laminar.

Germinación de la semilla. Después de su desinfección, las semillas fueron sembradas en frascos de cultivo de 100 mL, colocando 10 semillas por frasco. En cada frasco se adicionaron 20 mL de medio de cultivo con sales MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 30 g L^{-1} sacarosa, 0.5 g L^{-1} de carbón activado, sin reguladores de crecimiento vegetal y gelificado con 8 g L^{-1} de Agar. El pH del medio se ajustó a 5.7 y se esterilizó en autoclave a 1.5 kg/cm^2 de presión y una temperatura de $121.5\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos. Los cultivos se incubaron durante 30 días en un cuarto de incubación con un fotoperíodo de 16 h luz y ocho horas de oscuridad, con una intensidad lumínica de $18.83\text{ }\mu\text{M m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ a una temperatura de $25 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$, se consideró una semilla germinada cuando la radícula fue visible.

Identificación de microorganismos contaminantes encontrados en las semillas de *Agave*. Se aislaron los microorganismos contaminantes (hongos, bacterias y levaduras) encontrados en los tratamientos que presentaron contaminación y se sembraron en cajas Petri con medio PDA (Agar Dextrosa-Papa), para su aislamiento y purificación, posteriormente se enviaron al Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Universidad Autónoma del Estado de México, para su identificación taxonómica, en donde las muestras fueron resembradas en medio PDA y Agar sabouraud a $25 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ por 26 días, monitoreadas constantemente para su identificación morfológica, utilizando tinciones de lactofenol. Para la identificación de bacterias las muestras fueron sembradas en agar sangre y agar TSA (Agar Triptona-Soja) incubadas a $36\text{ }^\circ\text{C}$ y monitoreando constantemente por 5 días.

Variables evaluadas. Durante los 30 días del experimento, se evaluaron semanalmente las siguientes variables:

Porcentaje de contaminación de las semillas: ([Número de semillas contaminadas* 100] , número total de semillas sembradas)

Porcentaje de germinación de las semillas: ([Número de semillas que germinaron* 100] , número total de semillas sembradas)

Días a germinación: Se registró el número promedio de días a la emergencia de la radícula por semilla en cada especie.

Análisis estadístico. El diseño experimental para el presente trabajo tuvo una distribución completamente al azar en un arreglo bifactorial, con tres repeticiones. Los datos registrados en las variables de contaminación y germinación en las semillas se sometieron a un Análisis de Varianza de Clasificación Simple (ANOVA) y se realizó una prueba de comparación entre las medias Tukey ($p<0.05$), con ayuda del Sofware InfoStat. 2017.

RESULTADOS

El análisis de varianza para contaminación y germinación reveló un coeficiente de determinación de 0.78 y 0.97, respectivamente, indicando que el modelo utilizado fue adecuado para explicar la variabilidad de estas variables; así mismo el coeficiente de variación fue 34 % para contaminación y 103 % para germinación, explicando esto último por factores extrínsecos (tratamientos) e intrínsecos (genético - fisiológicos) de cada semilla y especie y confirmados estadísticamente al registrarse diferencias altamente significativas ($p<0.01$) en la interacción especies x tratamientos, indicando que al menos un tratamiento fue eficiente para ambas variables (contaminación y germinación) en por lo menos una especie (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de Varianza para las variables contaminación y germinación, evaluando 12 tratamientos de desinfección y siete especies de *Agave*.

F.V	Contaminación					Germinación				
	SC	gl	CM	F	p-valor	SC	gl	CM	F	p-valor
Especie	507.03	6	84.51	67.5	<0.0001	187.11	6	31.18	11.2	<0.0001
Tratamiento	1221.05	12	101.75	81.2	<0.0001	235.34	12	19.61	7.01	<0.0001
Especie x Tratamiento	1999.25	72	27.77	22.2	<0.0001	481.89	72	6.69	2.39	<0.0001
Error	114	91	1.25			254.50	91	2.80		
Total	3841.34	181				1158.84	181			
		R ² = 0.97		CV= 34.29%			R ² = 0.78		CV= 103.17%	

SC: Suma de cuadrados, gl: Grados de libertad, CM: Cuadrados medios, F: F calculada, CV: Coeficiente de variación y R²: Coeficiente de determinación.

Germinación. Al procesar los datos de germinación, las pruebas de medias mostraron diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) en los diferentes tratamientos, la respuesta de germinación fue muy variable en los diferentes tratamientos e independiente para todas las especies, puesto que cada especie respondió de manera

diferente y su tiempo de germinación también fue variable, en su mayoría esta variable fue baja (0 – 20 %) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Comparación de medias para las variables contaminación y germinación en siete especies de *Agave*, de acuerdo a la prueba de Tukey ($p<0.05$).

Tratamientos	<i>A. salmiana</i> DG (21d)		<i>A. horrida</i> (14d)		<i>A. marmorata</i> (8d)		<i>A. potatorum</i> (27d)		<i>A. karwinskii</i> (20d)		<i>A. angustifolia</i> (20d)		<i>A. cupreata</i> (14d)	
	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G	C	G
0 Sin ningún desinfectante	100 D	0 C	100 D	0 C	100 D	0 C	100 D	0 C	100 D	0 C	100 D	0 C	100 D	0 C
1 NaOCl	100 D	0 C	10 AB	10 BC	0 A	80 AB	0 A	10 BC	100 D	0 C	0 A	80 AB	0 A	10 AB
2 Ca(ClO) ₂	100 D	0 C	0 A	85 A	100 D	40 ABC	100 D	0 C	0 A	0 C	0 A	0 C	0 A	20 ABC
3 Ca(ClO) ₂ /NaOCl	0 A	60 ABC	0 A	85 A	100 D	85 A	0 A	0 C	100 AB	0 C	100 D	0 C	0 A	20 ABC
4 H ₂ O ₂	0 A	10 BC	0 A	0 C	0 A	70 ABC	0 A	85 A	0 A	0 C	40 ABC	20 ABC	0 A	10 BC
5 PM/Ca(ClO) ₂	100 D	0 C	0 A	10 BC	0 A	50 ABC	80 CD	0 C	10.0 D	0 C	100 D	0 C	0 A	50 ABC
6 PM/NaOCl	0 A	0 C	0 A	0 C	0 A	80 AB	100 D	0 C	0 A	0 C	50 BC	0 C	0 A	85 A
7 PM/ Ca(ClO) ₂ /NaOCl	10.0 D	0 C	0 A	20 ABC	0 A	10 BC	100 D	0 C	100 D	0 C	100 D	0 C	0 A	80 AB
8 PM/H ₂ O ₂	0 A	20 ABC	100 D	10 BC	0 A	10 BC	0 A	0 C	0 A	10 BC	0 A	10 ABC	0 A	0 C
9 PM/HgCl ₂ / Ca(ClO) ₂	0 A	0 C	10 AB	10 BC	0 A	40 ABC	0 A	0 C	0 A	20 ABC	30 AB	0 C	0 A	80 AB
10 PM/HgCl ₂ /NaOCl	100 D	0 C	0 A	30 ABC	0 A	10 BC	0 A	0 C	0 A	20 ABC	100 D	0 C	0 A	80 AB
11 PM/HgCl ₂ /Ca(ClO) ₂ /NaOCl	100 D	20 ABC	0 A	30 ABC	0 A	20 ABC	0 A	10 BC	40 ABC	10 BC	100 D	0 C	0 A	80 AB
12 PM/HgCl ₂ /H ₂ O ₂	0 A	50 ABC	0 A	30 ABC	0 A	90 A	0 A	30 ABC	0 A	20 ABC	00 A	85 A	0 A	80 AB

T: Tratamiento, 0: Testigo; DG = Días a germinación; a partir de la siembra *in vitro* C = Contaminación; G=Geminación. Letras iguales indican que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) entre los tratamientos.

Sin embargo, los resultados coinciden con los obtenidos en la variable contaminación. El único tratamiento que estimuló la germinación para las siete especies de *Agave* fue el tratamiento 12, en donde el porcentaje de germinación para la mayoría de las especies estuvo por arriba de los demás tratamientos, en *A. marmorata* (90 %), *A. angustifolia* (85 %), *A. salmiana* (50 %), *A. horrida* (30 %), *A. potatorum* (30 %), *A. cupreata* (30 %), y *A. karwinskii* (20 %). Por otro lado, *A. marmorata* fue la que tuvo una mejor respuesta, alcanzando un promedio de 90 % de germinación, además de ser la especie más temprana, germinando a los 8 días después de la siembra, resultando así la especie que se diferenció estadísticamente del resto (Cuadro 4).

Sin embargo, a pesar del bajo porcentaje de germinación para los otros tratamientos (0 – 20 %) ninguna de las plántulas obtenidas presentó anomalías en su germinación y desarrollo, independientemente del tratamiento utilizado y de la especie (Figura 1).



Figura 1. Germinación de semillas de *A. salmiana*. A) Emergencia y elongación radicular. (14 dds) B) Elongación de la plúmula. (21 dds) C) Diferenciación de los cotiledones y desarrollo de la raíz. (30 dds) D) Germinación y desarrollo completo. (14-30 dds) E) Plántulas normales completamente desarrolladas de *A. salmiana*. (50 dds); dds días después de la siembra.

Identificación de patógenos

Contaminación. La prueba de Tukey ($p<0.05$) determinó que existen diferencias altamente significativas entre todos los tratamientos aplicados, puesto que la mayoría de tratamientos disminuyeron diferencialmente la contaminación en las semillas. Sin embargo, estadísticamente sólo un tratamiento fue mejor al resto (Tratamiento 12), y se disminuyó completamente la contaminación (100 %) para todas las especies estudiadas, el cual consistió en aplicar Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 3 % por 24 h, PENTAMAX (PM) al 30 % (v/v) por 10 min y Cloruro de Mercurio II ($HgCl_2$) al 0.1 % (p/v) por 10 min. En contraste a lo anterior, los niveles más altos de contaminación se observaron en los tratamientos con Hipoclorito de Calcio e Hipoclorito de Sodio. Es importante aclarar que la contaminación de las semillas de *Agave* spp., en los diferentes tratamientos fue principalmente por hongos y en menor frecuencia por bacterias (Cuadro 4).

Identificación de microorganismos contaminantes. De manera general y por primera vez, se detectaron seis géneros de microorganismos asociados a las semillas de *Agave*. Los resultados del estudio taxonómico para las seis muestras analizadas revelaron cuatro géneros de hongos: *Monilinia* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Alternaria alternata*, una bacteria; *Bacillus* sp., y una levadura, *Schizosaccharomyces* sp. (Figura 2). Es de resaltar que en el aislamiento de microorganismos contaminantes *Aspergillus* y *Penicillium* se presentaron en todas las especies, mientras que otros fueron exclusivos de algunas especies, *Schizosaccharomyces* sp., se presentó en *A. marmorata*, *Alternaria alternata* en *A. angustifolia* y *Monilinia* sp., en *A. horrida*.

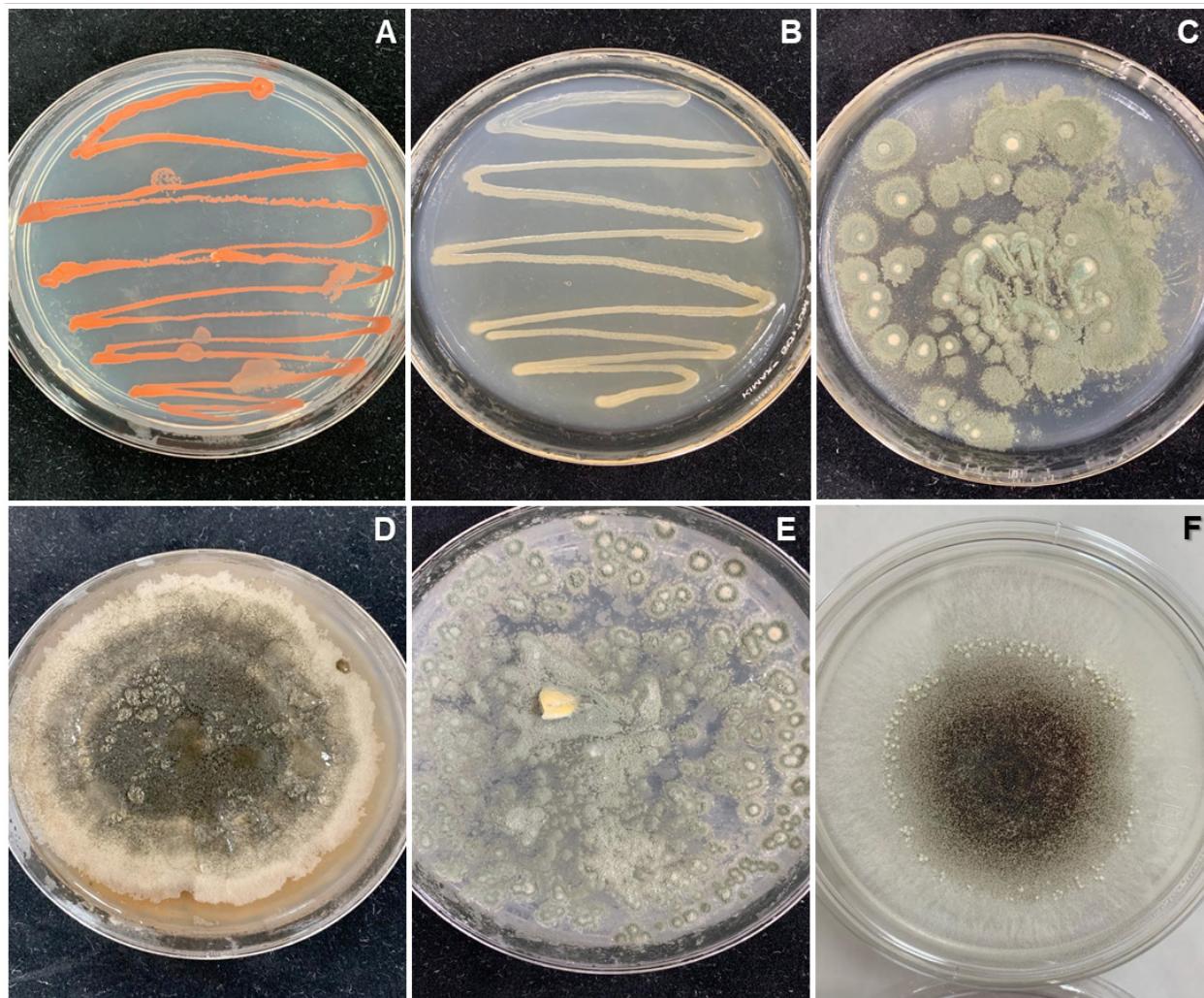


Figura 2. Cepas de patógenos encontrados en las semillas de *Agave* spp. A) *Schizosaccharomyces* sp. B) *Bacillus* sp. C) *Penicillium* sp. D) *Alternaria alternata*. E) *Aspergillus* sp. F) *Monilinia* sp.

Al evaluar la eficiencia de los tratamientos sobre el control de los patógenos, se pudo observar que la mayoría de los tratamientos tuvieron un control efectivo sobre bacterias, pero deficiente para hongos, esto en comparación con el tratamiento testigo. Sin embargo, el H₂O₂ presentó resultados favorables por encima de los demás tratamientos incluso en aquel donde se utilizó el desinfectante solo (Cuadro 5).

Cuadro 5. Microorganismos contaminantes presentes en las semillas de agave después de aplicar los tratamientos.

Tratamientos	<i>A. salmiana</i>			<i>A. angustifolia</i>			<i>A. horrida</i>			<i>A. marmorata</i>			<i>A. potatorum</i>			<i>A. karwisski</i>			<i>A. cupreata</i>				
	H	B	L	H	B	L	H	B	L	H	B	L	H	B	L	H	B	L	H	B	L		
1 Ca(ClO ₂)		x						x	x								x	x	x				
2 NaOCl		x								x	x			x									
3 Ca(ClO ₂)/NaOCl					x					x							x	x	x				
4 H ₂ O ₂				x																			
5 PM/Ca(ClO ₂)		x			x											x		x					
6 PM/NaOCl				x				x								x							
7 PM/Ca(ClO ₂)/NaOCl		x			x											x		x					
8 PM/H ₂ O ₂						x				x													
9 PM/HgCl ₂ /Ca(ClO ₂)					x				x														
10 PM/HgCl ₂ /NaOCl		x			x																		
11 PM/HgCl ₂ /Ca(ClO ₂)/NaOCl		x			x													x					
12 PM/HgCl ₂ /H ₂ O ₂																			x				

H: Hongos; B: Bacterias; L: Levaduras. X: Microorganismos presentes.

DISCUSIÓN

Germinación. Los porcentajes de germinación totales para la mayoría de las especies fueron mayores a los reportados por Ramírez *et al.* (2016) para *A. mapisaga*. (70 %) y *A. angustifolia* con 28 % de germinación. Además, las semillas de las siete especies de *Agave* presentaron germinación arriba del 50 % incluso en las especies con más años de colecta como *A. horrida* y *A. salmiana* coincidiendo con Castillo *et al.* (2022) quien reportó que semillas de *A. victoriae reginae* fueron viables después de un año de haber sido recolectadas y sugiere que es posible almacenar las semillas de esta especie al menos durante un año y tener porcentajes de germinación aceptables. De acuerdo, con los resultados de este estudio las semillas presentaron una viabilidad por arriba del 50 % siendo almacenadas en un banco de germoplasma por períodos más largos, sin embargo, se sugiere para próximos estudios, iniciar con la prueba de viabilidad con cloruro de tetrazolio, lo que dará claridad en la viabilidad obtenida.

Además, al analizar los días de germinación se puede afirmar que las semillas no presentaron latencia, característica propia de otras especies de *Agave* (Freeman

et al., 1977; Freeman, 1975). Esta ausencia de latencia en las semillas evaluadas es similar a las reportadas por Peña *et al.* (2006) para semillas almacenadas durante dos años de *A. salmiana*, que tuvieron menor latencia que aquellas sembradas en el mismo año de recolección.

Finalmente, en los tratamientos donde no hubo germinación para alguna especie, destacando el tratamiento testigo (T0) en el cual ninguna especie germinó se puede atribuir a la presencia de hongos y bacterias (contaminación), puesto que, las semillas afectadas por hongos fitopatógenos pueden presentar esclerotización, estromatización, decoloración, necrosis, pudrición de la raíz, reducción de tamaño, aborto e incapacidad germinativa (Ellis y Gálvez, 1980; Agarwal y Sinclair, 1987).

Contaminación. En *Agave* no se han reportado datos específicos para el tema de la desinfección. En el presente trabajo, el número promedio de semillas contaminadas más bajo (0- 10 %) se presentó en los tratamientos en los que se aplicó H₂O₂, sin embargo, al aplicar H₂O₂ al 3 % por 24 h en combinación con Sulfato de Cobre (PENTAMAX®) al 30% por 10 min y Cloruro de Mercurio II al 0.1 % por 10 min se logró una desinfección total de las semillas. En este género no se han reportado resultados similares con estos desinfectantes. Sin embargo, Flores *et al.* (2019) obtuvo altos niveles de desinfección aplicando H₂O₂ (3 % v/v) por 24 horas, en agitación constante. Esto puede deberse a que el peróxido de hidrógeno ejerce su actividad oxidante con la producción de radicales libres, que provocan un daño oxidativo a las proteínas y los lípidos en la membrana celular de los patógenos, comprobando su capacidad bactericida, viricida y fungicida. Cuando el H₂O₂ se mantiene en agitación, se reduce la demanda de oxígeno, por lo cual el H₂O₂ tiene mayor capacidad de oxidación que el cloro o el dióxido de cloro, además sus moléculas no dejan residuos tóxicos al liberar oxígeno (CNIB, 2023; Rodríguez *et al.*, 2009).

Por otra parte, Bedoya *et al.* (2016) reportaron que la inmersión de hojas de *Aloysia triphylla* en HgCl₂ al 0.2 % p/v durante 5 minutos permitió la obtención de más de un 80% de explantes viables y libres de contaminación. En cuanto a la desinfección con fungicidas, Barney (2003) disminuyó los hongos endófitos en plántulas de *Lepanthes rupestris* o *Lolium perenne* al aplicar Propiconazol o el Prochloraz. En resumen, todos los desinfectantes anteriores son eficientes, sin embargo, para agave el H₂O₂ en combinación HgCl₂ y sulfato de cobre es altamente eficiente para reducir la contaminación en semillas, permitiendo obtener un 100% de desinfección en las siete especies evaluadas.

Un nivel de contaminación intermedio se logró al aplicar Ca(ClO)₂ y NaOCl, contrastando esto con los resultados obtenidos en otras especies. Martínez *et al.* (2003) obtuvieron semillas de *Agave victoriae reginae* libres de patógenos utilizando

do NaOCl como desinfectante, el cual ha sido probado con efectividad contra bacterias, virus y hongos, ya que al ser diluido en agua se forma el ácido hipocloroso (HClO) que penetra fácilmente en las células de los microorganismos y actúa sobre sus proteínas y ácidos nucleicos (Auccasi, 2016); no obstante, según Lenntech (2008) para lograr una desinfección exitosa debe aplicarse una concentración adecuada al grado de infección de los organismos patógenos. Esto coincide con Álvarez *et al.*, (2008) que mencionan la buena efectividad del cloro y etanol como desinfectantes en bacterias patógenas, pero deficiente contra hongos y virus.

Mientras que los niveles más altos de contaminación se observaron en semillas libres de soluciones químicas (tratamiento testigo), el cual mostró una contaminación total en las semillas, por lo cual se puede deducir que no basta únicamente con lavar la semilla con agua corriente o jabón, se tienen que aplicar desinfectantes químicos para reducir la presencia de agentes patógenos. Finalmente, al hacer la comparación de diferentes especies y soluciones utilizadas los resultados evidencian la efectividad obtenida de cada una para *Agave* spp.

Identificación de microorganismos. De acuerdo con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, 2022), los tres géneros fúngicos pueden ser clasificados en tres grupos funcionales: hongos de campo (*Fusarium* y *Trichoderma*), hongos de almacenamiento (*Aspergillus* y *Penicillium*) y hongos contaminantes genéricos (*Monilia* y *Rhizopus*), cada uno con origen y hábitat particular.

Aspergillus y *Penicillium*, son géneros típicos en condiciones de almacenamiento, con habilidad para invadir semillas y granos de bajo contenido de humedad, crecer en amplio rango de temperaturas y con pocas excepciones, infectar antes de la cosecha. Colonizan activamente las semillas, donde causan deterioro y reducción en la germinación, a través de principios enzimáticos y toxinas (Howlett, 2006), confirmando con esto que aquellas semillas que presentaron una gran infestación de estos géneros no germinaron, siendo esta la principal razón. En semillas de moringa el género *Aspergillus* resultó ser el más versátil, al liderar las frecuencias de aparición, estando presente en la semilla de moringa tanto externa como internamente (Sabu *et al.*, 2022). En relación a *Monilinia*, es poca la información que se tiene al respecto, puesto que no se ha reportado en *Agave* u otras semillas. Habita mayormente regiones húmedas y ataca principalmente a frutales, siendo agente causal de la podredumbre marrón (Malvárez *et al.*, 2001). Se comporta como un patógeno de heridas, puesto que infecta frutos a partir de lesiones provocadas por insectos y/o roces mecánicos (Zúñiga *et al.*, 2011).

Alternaria alternata, se detectó con la mayor incidencia y exclusivamente en *A. angustifolia*. Este patógeno es un hongo saprófito y se dispersa por esporas a través de las corrientes de aire y mediante la movilización de semillas infectadas (DGSV,

2023). *A. alternata* causa enfermedades en varias plantas de importancia económica como brócoli, tomate, chile, papa, cítricos, manzana, etc. (Meena y Samal, 2019). Kurowski y Wysocka (2009) señalan que *A. alternata* está presente como un contaminante común en semillas de cereales y es la principal enfermedad fúngica aislada en semillas de amaranto y semillas de avena (Noelting *et al.*, 2016; Leyva *et al.*, 2014), sin embargo, no se tienen reportes para *A. angustifolia*.

Finalmente, de los géneros *Bacillus* sp. y *Schizosaccharomyces* sp., se tienen reportes como agentes benéficos principalmente *Bacillus*, el cual se ha reportado como uno de los principales géneros de antagonismo microbiano y como agente de control biológico para la agricultura, además en *Agave* se ha reportado como agente endófito que promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas (Beltran *et al.*, 2014). Sin embargo, en este trabajo de investigación ambos géneros se encontraron como agentes saprofitos contaminantes en semillas de *Agave*, de los cuales no hay reportes en otras semillas lo que podría abrir la puerta para investigaciones futuras.

CONCLUSIONES

Se evaluaron los 12 tratamientos propuestos y los resultados muestran que el tratamiento 12 consistente en Peróxido de Hidrógeno al 3 % por 24 h en combinación con Sulfato de Cobre (PENTAMAX®) al 30 % (v/v) por 10 min y Cloruro de Mercurio II al 0.1 % (p/v) por 10 min, fue el mejor en el control de microorganismos contaminantes presentes en las semillas de *Agave* spp., logrando un 100 % de desinfección y una germinación del 20 al 90 % dependiendo la especie, por lo que se recomienda para la desinfección de semillas de *Agave* spp.

Por primera vez en semillas de *Agave* se realizó la identificación taxonómica de los microorganismos contaminantes encontrados, reportando cuatro hongos (*Penicillium* sp., *Alternaria alternata*, *Aspergillus* sp., *Monilinia* sp.), una bacteria (*Bacillus* sp.) y una levadura (*Schizosaccharomyces* sp.), de los cuales *Alternaria alternata*, *Monilinia* sp., y *Schizosaccharomyces* sp., fueron específicos para *A. angustifolia*, *A. horrida* y *A. karwiski*, respectivamente. Además de reportar por primera vez los agentes desinfectantes que los controlan.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al equipo de investigación del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento de la Facultad de Ciencias Agrícolas, de la Universidad Autónoma del Estado de México por el apoyo y la guía en la elaboración de este trabajo de investigación.

LITERATURA CITADA

- Agarwal V and Sinclair J. 1987. Principles of seed pathology (2nd). India: CRC Press 176-166. <https://doi.org/10.1201/9780203710814>
- Álvarez A, Arzate F, Martínez M y Martínez V. 2020. Regeneración de plantas de *agave marmorata roezl*, por embriogénesis somática. Agroecosistemas tropicales y subtropicales 23(2). <https://doi.org/10.56369/taes.3117>
- Álvarez M, Rodríguez J y García R. 2008. Desinfección y selección de inóculo *in vitro* de *Abies religiosa*. Revista Chapin go serie Ciencias Forestales y del Ambiente 14: 11-14. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S200740182008000100002
- Arzate F, Piña E, Norman M, Reyes D, Guevara S y Vázquez G. 2016. Regeneración de agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw.) a partir de embriones somáticos encapsulados. Revista Fitotecnia Mexicana 39(4): 359-36. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018773802016000400359
- Barney D. 2003. Effects of light, surface sterilization, and fungicides on the germination of blackhuckleberry seeds. Small Fruits Review 2: 73-80. https://doi.org/10.1300/J301v02n02_06
- Bedoya P, Sánchez J, Bermúdez G y Ramírez R. 2016. Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de cultivo *in vitro* de *Aloysia triphylla*. Biotecnología en el Sector. [http://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(14\)38-46](http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(14)38-46)
- Beltrán G, White F, Prado M, Prieto R, Yamaguchi F, Torres S, Kato J, Medeiros G y Mascio D. 2014. Adquisición de nitrógeno en *Agave tequilana* a partir de la degradación de bacterias endófitas. Scientifics Report (4). <https://doi.org/10.1038/srep06938>
- Billard C, Dalzotto C y Lallana V. 2014. Desinfección y siembra asimbiótica de semillas de dos especies y una variedad de orquídeas del género *oncidium*. Polibotánica 38: 145-157. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S14052768201400200008&script=sci_abstract#:~:text=En%20la%20siembra%20asimbi%C3%B3tica%20de%20semillas%20de%20orqu%C3%ADdeas%2C,Murashige%20y%20Skoog%20a%20la%20mitad%20de%20concentraci%C3%B3n
- Campos R, Marcela A y Campos R. 2020. Establecimiento de un protocolo de desinfección y micropagación *in vitro* de “caoba” (*Swietenia macrophylla* King (Meliaceae)). Arnaldoa 27 (1): 141-156. <http://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.271.27107>
- Castillo R, Castillo Q, Sáenz C, Rueda S y Sáenz R. 2022. Efectos del pretratamiento con *Trichoderma* y *Bacillus* en la germinación de semillas de *Agave victoriae-reginae* T. Moore. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 13 (69): 56-72. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v13i69.844>
- Centro Nacional de Información Biotecnológica (CNBI). 2023. Peróxido de hidrógeno. Resumen del compuesto PubChem para CID 784. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrogen-Peroxide>. (consulta, marzo 2023)
- Delgado A, González A, Santacruz R, Folgado R y Portillo L. 2021. Embriogénesis somática indirecta y criopreservación del cultivar de *Agave tequilana* Weber ‘Chato’. Plantas, 10(2): 249.
- DGSV-DCNRF. 2023. Mancha foliar y tizón del amaranto. *Alternaria alternata*. Sader-Senasicia. Dirección General de Sanidad Vegetal-Dirección del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Ficha Técnica. Tecámac, Estado de México. 7 p.
- Domínguez R, González J, Rosales G, Quiñones V, Delgadillo D, Mireles O y Pérez M. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. Investigación y Ciencia 41:53-62. <https://www.redalyc.org/articulo.ox?id=67404109>
- Ellis M y Gálvez G. 1980. Problemas de producción del frijol: Enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 301-314.
- Flores A, Romero S, Pérez M y Pineda O. 2019. *Nolina parviflora*, desinfección de semilla y su implicación en la conservación. Mitigación del daño ambiental agroalimentario y forestal en México 5. 6: 109-121. https://www.researchgate.net/publication/338111207_Nolina_parviflora_desinfeccion_de_semilla_y_su_implicacion_en_la Conservacion
- Freeman C, Tiffany S y Reid H. 1977. Germination responses of *Agave lechuguilla*, *A. parryi*, and *Fouquieria splendens*. The Southwestern Naturalist 22(2):195-204. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:87927711>
- Freeman C. 1975. Germination responses of a New Mexico population of Parry agave (*Agave parryi* Engelm. var. *parryi*) to constant temperature, water stress and pH. The Southwestern Naturalist 20(1):69-74. <https://doi.org/10.2307/3670012>
- García A. 2007. Los agaves de México. Ciencias 87: 14 -23. <https://revistacienciasunam.com/es/48-revistas/revista-ciencias-87/285-los-agaves-de-mexico.html>

- García A, Martínez F y Sandoval D. 2019. Cuatro especies nuevas de Agave (Asparagaceae, Agavoideae) del sur de México. Acta Botánica Mexicana 126: e1461. <https://doi.org/10.21289/abm126.2019.1461>
- Howlett B. 2006. Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. Current Opinion Plant Biology 9 (4): 371-375. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.004>
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 2022. Importancia de la patología de semillas en el almacenamiento de granos. <https://inta.gob.ar/documentos/importancia-de-la-patologia-de-semillas-en-el-almacenamiento-de-granos>
- Kurowski T and Wysocka U. 2009. Fungal communities colonizing grain of hulled and naked oat grown under organic farming system. Phytopathologia 54: 53-59. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:83362843>
- Lenntech. 2008. Hipoclorito de sodio. <http://www.lenntech.com/espanol/Desinfeccion-del-agua/desinfectantes-hipoclorito-de-sodio.htm>
- Leyva M, Cervantes G, Villaseñor M, Rodríguez G, García L y Tovar P. 2014. Diversidad de hongos en semilla de avena del Valle Central de México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 8: 1379-1385. <https://cienciasagrícolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/1090/920>
- Malvárez G, Rodríguez A, Aguilar C, Silvera E y Mondino P. 2001. Identificación de especies de *Monilinia* spp. en aislamientos obtenidos de *Prunus* spp. por PCR con Primers específicos. Agrociencia 5(1): 48-53. <http://www.fagro.edu.uy/~agrociencia/index.php/directorio/article/view/569/477>
- Martínez P, Ortega L, Chávez V y Adios R. 2003. Embriogénesis somática y organogénesis del *Agave victoriae-reginae*: Consideraciones para su conservación. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74: 135-142. <https://doi.org/10.1023/A:1023933123131>
- Meena M and Samal S. 2019. *Alternaria* host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects. Toxicology Reports 6: 745-758. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.06.021>
- Monja M y Robert M. 2013. Embriogénesis somática directa de *Agave fourcroydes* Lem. a través del cultivo de capa celular delgada. In Vitro Cell Dev Biol—Plant 49:541–549. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>
- Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Noelting M, Sandoval M y Molina M. 2009. Revisión de las principales patologías que afectan al cultivo de amaranto en Argentina. Jornadas Amaranto La Plata 2009. 25.
- Peña V, Sánchez U, Aguirre R, Trejo C, Cárdenas E and Villegas M. 2006. Temperature and mechanical scarification on seed germination of maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick). Seed Science & Technology 34: 47-56. <https://doi.org/10.15258/sst.2006.34.1.06>
- Ramírez M, Borodanenko A, Pérez M, Salas A, Nuñez P and Ochoa A. 2008. *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 94:201-207. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9405-x>
- Ramírez T, Peña V, Aguirre R, Reyes A, Sánchez U and Valle G. 2012. Seed germination temperatures of eight Mexican *Agave* species with economic importance. Plant Species Biology 27:124-137. <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2011.00341.x>
- Rodríguez M, García R y Muñoz M. 2009. Obtención de un producto coagulante a partir de semillas de *Moringa oleifera* Lam., tropicalizada en Cuba. <http://www.monografias.com/trabajos15/coagulante-moringa/coagulante-moringa.shtml>
- Sabu, Silva A y Sánchez C. 2022. Fitopatógenos fúngicos asociados a semillas de moringa en el estado Monagas, Venezuela. Revista Científica la calera 22 (39): 118-126. <https://doi.org/10.5377/calera.v22i39.15094>
- Tamayo D, Perez, J y Meneses E. 2017. Evaluación de métodos para erradicar hongos endófitos de raíces en semillas de *Brachiaria decumbens* stapf. Revista de la facultad de ciencias 2:87-101. <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v6n2.64691>
- Zúñiga J, Biurrun R, Garnica I, Lezaun J y Llorens M. 2011. Las moniliosis. Navarra Agraria. [https://www.navarraagraria.com/categories/item/710lasmoniliosis#:~:text=Se%20denomina%20moniliosis%20o%20podredumbre,Monilinia%20frut%C3%ADcola%20\(Anamorfo%20Monilia](https://www.navarraagraria.com/categories/item/710lasmoniliosis#:~:text=Se%20denomina%20moniliosis%20o%20podredumbre,Monilinia%20frut%C3%ADcola%20(Anamorfo%20Monilia)
- Zúñiga O y Beauregard Z. 2020. Evaluación de tres productos desinfectantes sobre semillas de maíz y cebada para la producción en la tecnología de Forraje Verde Hidropónico. Repertorio Científico 23 (2): 63-75. <https://doi.org/10.22458/rc.v23i2.3180>
- Zurita V, Gómez C, Atrián M, Hernández G, Granados G, García M, Salgado G y Sánchez V. 2014. Establecimiento de un método eficiente de germinación *in vitro* y micropropagación del cirimo (*Tilia mexicana* Schlecht.) (Tiliaceae). Polibotánica 38: 129-144.