

ESTABLECIMIENTO DE AGAVE (*Agave tequilana* Weber var. azul) EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT)

Carmen Sanjuana Delgado Ramírez (1), Héctor Gordon Núñez Palenius (2)

1 [Ingeniería en Agronomía, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [csdelgado28@hotmail.com]

2 [Departamento de Agronomía, División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [palenius@ugto.mx]

Resumen

El género *Agave* forma parte de la familia de plantas agaváceas, y una de las especies más importantes de este género es el *Agave tequilana* var. azul. Esta planta es utilizada en la elaboración del tequila, actualmente una de las bebidas más famosas a nivel mundial. La producción de esta planta se ha visto afectada por graves problemas, principalmente de tipo fitosanitario. Una alternativa para mejorar este cultivo es la aplicación de técnicas de micropropagación utilizando medios de cultivo líquido. El objetivo del trabajo fue evaluar la influencia de dos reguladores de crecimiento vegetal (IBA y Cinetina), en la inducción de brotes en *Agave tequilana* Weber. var. Azul, utilizando un sistema de inmersión temporal. Se adecuaron frascos biorreactores en los que se colocaron 35 ml de medio MS con diferentes concentraciones de los dos reguladores de crecimiento y se colocó un explante por frasco. El proceso de inmersión consistió en mantener el explante sumergido 1 minuto en el medio de cultivo una vez al día. Se tomaron datos una vez por semana. El análisis de varianza mostró que existieron diferencias significativas para el factor IBA y la variable altura de planta.

Abstract

The genus *Agave* is part of the Agavaceae plant family, and one of the most important species of this genus is the *Agave tequilana* var. Blue. This plant is used in the production of tequila, currently one of the most famous drinks worldwide. The production of this plant has been affected by serious problems, mainly of type phytosanitary. An alternative for improving this growing is the application of techniques of micropropagation using liquid culture media. The objective of the study was to evaluate the influence of two plant growth regulators (IBA and Kinetin), in the induction of outbreaks in *Agave tequilana* Weber. var. Blue, using a system of temporary immersion. Adapted vials bioreactors in which were placed 35 ml of MS medium with different concentrations of the two regulators of growth and placed an explant per bottle. Dipping process consisted in maintaining the explant dipped 1 minute in the culture medium once a day. Data is collected once a week. The analysis of variance depicted that there were significant differences for the IBA factor and the plant height variable.

Palabras Clave

Inducción de brotes; Reguladores de crecimiento; Ácido Indolbutírico; Cinetina; Organogénesis somática.

INTRODUCCIÓN

El género *Agave* forma parte de la familia de plantas *agaváceas* o *agavaceae* (por su nombre científico) y pertenece a la clase de las monocotiledóneas. Aún no existe acuerdo en su delimitación taxonómica, sin embargo, los especialistas hablan de más de 200 especies que forman parte de este género, entre las cuales se encuentra el *Agave tequilana* Weber. Por su diversidad, el género *Agave*, se convierte en el más rico de entre los nueve que conforman la familia *Agavaceae* [1].

El *Agave tequilana* es una planta que crece en zonas áridas y cálidas, que se caracteriza por tener forma de roseta, se reproduce principalmente por hijuelos, crece entre 1.2 y 1.8 m de altura. Sus hojas presentan un color azul-verdoso, son delgadas y casi planas; miden aproximadamente 1.25 m de largo y 10 cm de ancho y tiene una espina terminal de color rojo oscuro de 2 cm. Su inflorescencia es una panícula de 5 a 6 m de altura, densamente ramosa a lo largo [2].

El *Agave tequilana* Weber variedad Azul es utilizado en la elaboración del tequila, actualmente una de las bebidas más famosas a nivel nacional e internacional.

Dada la importancia de la producción del tequila en el país, en 1974 se estableció la “denominación de origen”, en donde se han señalado las características que debe tener o con que debe cumplir el agave. Además se delimitó una zona geográfica para la producción de agave que se utiliza para la elaboración del tequila, que comprende 181 municipios de cinco estados de la República Mexicana: Jalisco con 125 municipios, Nayarit con 8, Guanajuato con 7, Tamaulipas con 11 y Michoacán con 30 [3].

Sin embargo la producción de *Agave tequilana* Weber var. azul se ha visto afectada por graves problemas de tipo fitosanitario causados principalmente por hongos y bacterias, siendo la marchitez del agave una de las enfermedades que causa mayor daño.

Una alternativa para mejorar el cultivo del *Agave tequilana*, es la aplicación de técnicas de micropropagación y mejoramiento derivadas de la biotecnología vegetal, como la micropropagación en medio sólido, ya que aporta mayores ventajas, es clonal y mantiene las características genotípicas del progenitor, además; la multiplicación sucede en lapsos cortos y poco espacio en comparación a la multiplicación tradicional, y se obtienen plantas sanas y libres de patógenos [4].

Recientemente se han establecido sistemas de micropropagación utilizando medios de cultivo líquidos con el objetivo de automatizar la propagación de plantas, aumentar el número de éstas por explante y por lo tanto disminuir los costos de producción. Esto se ha logrado con el diseño de biorreactores de inmersión temporal.

Hipótesis

Se incrementará el número de explantes obtenidos en un sistema de inmersión temporal en comparación con los inducidos en la micropropagación en medios sólidos.

Objetivo

Evaluar la influencia de dos reguladores de crecimiento (IBA y Cinetina), en la inducción de brotes en *Agave tequilana* Weber. var. azul, utilizando un sistema de inmersión temporal.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la División Ciencias de la Vida campus Irapuato- Salamanca de la Universidad de Guanajuato.

Para el establecimiento en el sistema de inmersión temporal (SIT) de *Agave tequilana* se acondicionaron biorreactores usando frascos de jugo con capacidad de 413 ml, a los que se les introdujo malla plástica, que serviría de soporte para el explante con una altura de 3.5 cm y la base de soporte con un área de 16cm². Además se prepararon tapones de goma a los que se les implantó una manguera rellena de algodón. El experimento, de tipo factorial, consistió en la evaluación de diferentes concentraciones de las hormonas cinetina (1mg/l, 5mg/l, 6mg/l y 10mg/l) y ácido indolbutírico (0.5mg/l, 2.5 mg/l, 3 mg/l y 5mg/l), evaluando 16 diferentes tratamientos con tres repeticiones cada uno. El medio de cultivo que se utilizó fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) a una concentración del 100%, usando como fuente de carbono glucosa (15 g/ L). Se colocaron 35 ml de medio por frasco; posteriormente se suplementaron las dos reguladores de crecimiento en sus diferentes concentraciones, de acuerdo con el tratamiento; ajustando el pH en 5.7.

Una vez que se colocó el medio con la concentración de los reguladores de crecimiento en los frascos biorreactores, éstos se taparon con papel aluminio y se esterilizaron durante 20 min a una presión de 15 lb/pulg² y a una temperatura de 121 °C en autoclave. A diferencia del medio en los biorreactores, los tapones se esterilizaron por 40 minutos. Cumplido el tiempo de esterilización los tapones y frascos se llevaron bajo la campana de flujo laminar, dejando enfriar, para después colocar el explante dentro del biorreactor.

Se utilizó un explante por biorreactor de *Agave tequilana* Weber variedad azul “el Coronel” de la

accesión 39 de la Colección Nacional de Agaves UG-SAGARPA. Dichos explantes se encontraban en un medio sólido MS (Murashige y Skoog, 1962) con reguladores de crecimiento (1 mg/L de BAP y 25 µL de 2-4, D).

Previo a colocar el explante en el biorreactor este fue limpiado, es decir se desprendieron las raíces, hojas basales y se cortaron los extremos necrosados.

Tras colocar el explante limpio en cada biorreactor este se selló, rotuló y finalmente fue colocado en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 27 °C y con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

En el proceso de inmersión los explantes se sumergieron por 1 minuto cada 24 horas, realizando una evaluación cada semana. Las variables evaluadas fueron número de puntas, altura del explante, anchura del dosel, número de brotes, número de raíces y necrosis. Se realizó un análisis de varianza y una comparación de medias por la prueba de Tukey utilizando el software Statgraphics versión Centurión de los datos obtenidos de la diferencia de la última semana en que se tomaron datos menos los datos obtenidos en la semana inicial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inducción de brotes no se presentó de manera significativa en el experimento, ya que solo dos explantes desarrollaron un brote (imagen 1), en los tratamientos 6 (2.5 mg/L de IBA con 5 mg/l) y 7 (2.5 mg/L de IBA con 6 mg/l). Esto corresponde solo al 4.16% del total de los explantes. Aunque cabe mencionar que la coloración de los brotes desde su aparición fue de un tono verde oscuro.

En un trabajo similar mediante la micropropagación de agave (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) a través de yemas axilares, es



IMAGEN 1: Explantes de los tratamientos 6 (izquierda) y 7(derecha), únicos del experimento que desarrollaron brotes.

señalado que en el desarrollo de brotes intervinieron el medio de cultivo (Murashige y Skog, 1962) y las concentraciones de auxina y citocinina que se utilizaron (24.6 μ M de Ácido Indol Butírico (AIB) y 46.46 μ M Cinetina), ya que propiciaron la inducción de brotes a partir de la cuarta semana posterior a la siembra [6].

Para cada una de las variables la significancia obtenida con el análisis estadístico fue diferente (Tabla 1). En la variable número de puntas no se observó significancia para ambos factores ni para la interacción, más en lo que respecta al mayor número de puntas en los tratamientos 1 (0.5 mg/L de IBA con 1 mg/l de Cinetina) y 12 (2 mg/L de IBA con 10 mg/l de Cinetina) se obtuvieron el mayor número de puntas (2 puntas).

En cuanto a la altura del explante se observó que solo el factor A (IBA) es significativo para esta variable. Dicha significancia indica que el factor influye de manera positiva en el aumento de altura para los explantes. En el tratamiento 6 (2.5 mg/L de IBA con 5 mg/l de Cinetina) se obtuvieron los valores más altos que corresponden a un aumento de 3.5 cm en la altura del explante.



IMAGEN 2: Explante del tratamiento 6 el cual tuvo un incremento de 3.5 cm de altura.

La variable anchura del dosel no presentó significancia para los factores y la interacción, sin embargo, en el tratamiento 5 (2.5 mg/L de IBA con 1 mg/l) de Cinetina) se obtuvo el mayor incremento con un valor de 2.4 cm. Con respecto a la variable

Tabla 1: Valores de P obtenidos del Análisis de Varianza de los datos de la semana 4 a la 0.

Fuente de Variación	Valor de P				
	Nº de puntas	Altura	Anchura del dosel	Nº de brotes	Nº de raíces
1. Factor A (IBA)	0.2724	0.0074	0.2073	0.1338	0.6169
2. Factor B (Cinetina)	0.2724	0.6869	0.3720	0.5787	0.0727
3. AB	0.4750	0.0929	0.5712	0.7322	0.5082

número de raíces, tras realizar el análisis se observó que no hubo significancia para los factores y la interacción. Siendo los tratamientos 5 (2.5 mg/L de IBA con 1 mg/l) y 9 (3 mg/L de IBA con 1 mg/l) en donde se formaron el mayor número de raíces (5 raíces).

Con respecto a la comparación de medias (tabla 2) para las variables número de puntas, anchura del dosel, número de brotes y número de raíces no hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95.0% de confianza. Mientras que en la variable altura se presenta la formación de dos grupos, donde 9 de las medias pertenecen a ambos grupos, siendo diferente la media del tratamiento 6 (grupo a) con las medias de los tratamientos 11, 12,13, 14 y 15, por tanto solo entre estos existieron diferencias estadísticamente significativas.



IMAGEN 3: Explante del tratamiento 9 donde se desarrollaron mayor cantidad de raíces.

Tabla 2. Separación de medias por la prueba de Tukey (95% de significancia).

Tratamientos	Variables				
	N° de puntas	Altura	Anchura del dosel	N° de Brotes	N° de Raíces
T ₁	2 a	2.5ab	2.33a	0a	3.6a
T ₂	0.66a	1.16ab	0.93a	0a	2.33a
T ₃	1.33a	2ab	0.23a	0a	2.66a
T ₄	0.66a	1.76ab	1.26a	0a	4a
T ₅	0.33a	1.53ab	0.33a	0a	5a
T ₆	1.66a	3.51a	0.73a	0.33a	3.66a
T ₇	0.66a	1.53ab	0.43a	0.33a	3.60a
T ₈	1.66a	1.50ab	0.66a	0a	1.60a
T ₉	1.33a	0.83b	1.10a	0a	5a
T ₁₀	1a	1.4ab	1.10a	0a	2a
T ₁₁	2a	0.8b	0.76a	0a	3.33a
T ₁₂	2a	0.83b	0.93a	0a	3.33a
T ₁₃	1a	0.63b	0.7a	0a	3.66a
T ₁₄	1.66a	0.6b	0.76a	0a	3.33a
T ₁₅	1a	1.33b	1.5a	0a	2a
T ₁₆	1.33a	1.16b	1.5a	0a	1.66a

CONCLUSIONES

Se descartan todos los tratamientos como opción para la obtención de brotes en un periodo de 4 semanas.

Los mejores tratamientos en cuanto a las variables evaluadas fueron, el T₁ y T₁₂ para número de puntas, el T₆ destacó por presentar el mayor incremento en altura, mientras que el T₅ presentó el más alto valor en ancho de dosel. El T₅ y T₉ sobresalen en la variable número de raíces.

Entre los factores Cinetina e IBA, se observó muy poca interacción, se propone disminuir la concentración del ácido indolbutírico a valores

REFERENCIAS

- [1] Vázquez-García, J. A. et al. 2007. Agaves del Occidente de México. Universidad de Guadalajara. Zapopan, México. 221 pp.
- [2] Granados, S. D. (1993). *Los Agaves en México*. Universidad Autónoma de Chapingo. México pp. 102, 108, 112 y 113.
- [3] Consejo Regulador del Tequila (CRT). 2005. Denominación de origen. Recuperado de <https://www.crt.org.mx/index.php/denominacion-de-origen/semblanza>
- [4] Herrera – Herrera José Luis, Robert Manuel L. (2005). Manual de procedimiento del sistema de micropropagación de Agave tequilana Weber empleando biorreactores BioMINT. Recuperado de <http://148.206.53.84/tesuami/UAMI13518.pdf>
- [5] Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- [6] Angeles Espino, A. J. Valencia, G. Virgen Calleros C. Ramírez Serrano, L. Paredes Gutiérrez, S. Hurtado (2012). Micropropagación de Agave (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) a través de yemas axilares. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 15 693 – 698.