

Micropropagación de *agave tequilana* Weber Variedad Azul “El Coronel” en un Sistema de Inmersión Temporal (SIT)

Morales González Beatriz (1), Héctor Gordon Nuñez Palenius (2)

1 [Licenciatura en Biología Ambiental, Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Lerma] | Dirección de correo electrónico: [2113068976@correo.ler.uam.mx]

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

Resumen

El *Agave tequilana* Weber variedad Azul es una especie con alta importancia ecológica, económica y cultural, sin embargo podría verse amenazada debido a la alta producción de tequila, daños por plagas, lento crecimiento y baja reproducción. Es evidente que se requieren estrategias que aseguren la conservación del agave azul, ante la situación, la aplicación de técnicas de propagación a partir de biotecnología vegetal, en este caso la micropropagación *in vitro*, podría fungir como alternativa. En este sentido, el objetivo del presente estudio fue evaluar la eficiencia de Ácido Indol Butírico (AIB) y 2-Isopentenil-adenina (2iP) en la generación de brotes en explantes de Agave tequilana Weber variedad Azul “El Coronel”, en un sistema de inmersión temporal (SIT). Se aplicaron una serie de experimentos factoriales, 16 tratamientos con 3 repeticiones, utilizando 48 explantes de agave azul, los cuales se monitorizaron cada semana evaluando el desarrollo fisiológico y producción de brotes. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.15., además de aplicar una prueba de medias Tukey. Los resultados obtenidos arrojan una mayor eficiencia en el desarrollo fisiológico de la especie para el Tratamiento 14 (0.525 mg/L de AIB y 0.525 mg/L de 2iP).

Abstract

Tequilana Weber Agave Azul variety is a species with high ecological, economic and cultural importance, but could be threatened due to the high production of tequila, pest damage, slow growth and low reproduction. Clearly, strategies that ensure the conservation of the blue agave, before the situation is required, the application of propagation techniques from plant biotechnology, in this case the *in vitro* micropropagation could serve as an alternative. In this sense, the objective of this study was to evaluate the efficiency of indole butyric acid (AIB) and 2-isopentenyl-adenine (2iP) in causing outbreaks in explants variety tequilana Weber Blue Agave "Colonel" in a system temporary immersion (SIT). A series of factorial experiments were applied, 16 treatments with 3 repetitions using 48 explants of blue agave, which were monitored weekly by assessing the physiological development and production of sprouts. An analysis of variance (ANOVA) was performed using the Statgraphics program Centurion XVI Version 16.1.15., besides applying Tukey test medium. The results show a greater efficiency in the physiological development of the species Treatment 14 (0.525 mg / L IBA and 0.525 mg / L 2iP).

Palabras Clave

AIB; biotecnología; conservación; tequila; 2iP.

INTRODUCCIÓN

Generalidades

La ubicación geográfica de México le ha permitido contar con innumerables especies de flora y fauna, especies que por su valor ecológico, económico y cultural han sido reconocidas a nivel mundial, tal es el caso del grupo de agaves localizados en la Meseta Central de nuestro país, de los cuales muchos son endémicos de la región. Actualmente existen 26 estados de la República Mexicana dedicados al cultivo de agave. Dentro de los beneficios que podemos obtener de este grupo de especies se encuentra la producción de bebidas, principalmente el “tequila”, el mezcal, el pulque, con fines alimenticios como jarabe, miel, vinagre, obtención de larvas, etc., en tejidos como hilos, telas, entre otros [1].

El tequila azul y su estado de conservación

Dentro del grupo de agaves se encuentra el agave azul (*Agave tequilana* Weber), especie cultivada principalmente para la producción de tequila, con 60 000 hectáreas de superficie cultivadas a nivel nacional. Hoy en día, las nuevas técnicas para incrementar la producción de esta bebida, los daños causados por plagas en los cultivos, el control de plagas y malezas, el lento crecimiento de la especie, la baja tasa de reproducción sexual

y asexual, son algunos de los factores que limitan su crecimiento y propagación, en este mismo sentido también las técnicas de propagación han perturbado la variación genética de la especie [2, 3, 4].

Ante la situación, es evidente que se requieren estrategias que aseguren la conservación del agave azul para seguir obteniendo los beneficios que nos otorga. Una de las alternativas para la resolución de estas limitantes es la aplicación de las técnicas de propagación a partir de biotecnología vegetal.

Micropropagación

La técnica más utilizada en biotecnología vegetal es la micropropagación *in vitro*, la cual permite incrementar de manera significativa y en poco tiempo la producción de vitroplántulas con las mismas características fenotípicas de la especie que inicialmente se siembra, además de que se obtienen plantas sanas y libres de patógenos [5].

Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)

Durante los últimos años el cultivo de tejidos vegetales se ha convertido en una herramienta de gran utilidad para la propagación de diversas especies de agave. En 1997, surgió el primer Sistema de Inmersión Temporal, en donde a partir de un flujo de aire a uno de los frascos, se hacía

subir el medio de cultivo, mojar los explantes y luego descender. Este SIT ha evolucionado con el paso del tiempo, logrando una mejor micropropagación de las especies y altos niveles de supervivencia en campo [6].

Hipótesis

La aplicación de altas concentraciones de Ácido Indol Butírico (AIB) y 2-Isopentenil-adenina (2iP) inducen el desarrollo de las plántulas de agave azul en el Sistema de Inmersión Temporal (SIT).

Objetivo

Evaluar la eficiencia de Ácido Indol Butírico (AIB) y 2-Isopentenil-adenina (2iP) en la generación de brotes en explantes de *Agave tequilana* Weber variedad Azul “El Coronel”, en un sistema de inmersión temporal (SIT).

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales, de la División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato, Guanajuato México. Se utilizaron 48 explantes de *Agave tequilana* Weber variedad Azul “El Coronel” de la Colección Nacional *in vitro* de la Universidad de Guanajuato-SAGARPA, como material biológico, cuyo tamaño osciló entre los 2 y 8 cm, vigorosos y sin daño por fitopatógenos, procedentes de plantas de dos a tres años de edad (Imagen 1).



IMAGEN 1. Individuo de la especie *Agave tequilana* Weber variedad Azul “El Coronel”.

Se aplicaron una serie de experimentos factoriales, 16 tratamientos con 3 repeticiones colocando un explante por tratamiento.

Se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100% suplementado con diferentes balances de Ácido Indol Butírico (AIB) y 2-Isopentenil-adenina (2iP), (Tabla 1). En el fondo de cada frasco biorreactor se colocó una malla de polietileno, de manera que el explante sembrado no tocara el medio líquido (Imagen 2).

Tabla 1. Concentraciones de los reguladores vegetales de crecimiento utilizados: Ácido Indol Butírico (AIB) y 2-Isopentenil-adenina (2iP), para cada uno de los tratamientos aplicados.

AIB mg/L	2iP mg/L			
	0.105	0.525	0.630	1.050
0.053	T1	T2	T3	T4
0.263	T5	T6	T7	T8
0.315	T9	T10	T11	T12
0.525	T13	T14	T15	T16

Previo a la esterilización se ajustó el pH a 5.7-5.8 de cada tratamiento, para transferir el medio en dosificaciones de 35 mL en frascos de vidrio de 413 mL. Los frascos fueron cubiertos con papel

aluminio y se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a una presión de 20 lb/pulg² y a una temperatura de 115 °C.



IMAGEN 2. Frascos biorreactores que contienen el medio de cultivo MS, suplementado con los diferentes balances de AIB y 2iP.

Los frascos biorreactores se llevaron bajo la campana de flujo laminar y se colocaron los explantes en cada frasco, se sellaron con tapones previamente esterilizados y se rotularon y transfirieron al cuarto de crecimiento a una temperatura de 27°C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad (Imagen 3).



IMAGEN 3. Frascos biorreactores con explante, sellados y rotulados en el cuarto de crecimiento.

Los explantes se sumergieron en el medio de cultivo durante un minuto por día, y se monitorizaron cada 24 horas para realizar la

evaluación sobre el desarrollo fisiológico: alto y ancho del dosel, número de brotes, número de raíces, contaminación y necrosis. El registro de los datos se realizó cada 8 días por 4 semanas consecutivas. Los frascos contaminados se transfirieron a la campana de flujo laminar para extraer el explante sembrado y cambiar el medio de cultivo.

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA multifactorial), con el fin de determinar los efectos de los diferentes tratamientos y las interacciones entre ellos [7], utilizando el programa Statgraphics Centurion XVI Versión 16.1.15., además de aplicar una prueba de medias Tukey ($P \leq 0.05$) para comparar los diferentes tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza (ANOVA 2 factores) arrojó valores de p por encima de 0.05 (Tabla 2), para las variables alto, dosel, n° puntas y n° raíces, en el caso de n° brotes, no se obtuvieron datos. Lo anterior indica que no existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos de los reguladores vegetales de crecimiento (RVC) aplicados: AIB y 2iP, es decir, ninguno de los factores fue significativo dado que todos los niveles tienen rangos parecidos y lo que se espera es que por lo menos uno se encuentre separado de los demás.

Tabla 2. Resultados del análisis de varianza para las variables medidas: alto, dosel, n° puntas y n° raíces.

Efectos principales	Valor-P			
	Alto	Dosel	N° Puntas	N° Raíces
A:AIB μ l	0.3495	0.9345	0.7692	0.1796
B:2iP μ l	0.4658	0.9733	0.5367	0.8500
Interacciones				
AB	0.1823	0.3822	0.9309	0.5516

En general, tomando como base las ANOVAS de cada una de las variables se observa que ningún tratamiento generó un efecto muy diferente de los demás, es decir, que los explantes mantienen el mismo crecimiento en cuanto a las variables medidas, sin importar la cantidad de RCV aplicados y la cantidad. Pese a lo anterior, el tratamiento que tuvo un mayor efecto fue el T14 (0.525 mg/L de AIB y 0.525 mg/L de 2iP), el cual generó un mayor desarrollo de puntas y raíces. De acuerdo al análisis de separación de medias por la prueba de Tukey ($P \geq 95\%$), para ninguna de las variables se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos correspondientes (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la comparación de medias por prueba Tukey para cada uno de los tratamientos aplicados.

Tratamiento	Comparación de medias			
	Alto	Dosel	N° puntas	N° raíces
T1	1.5	1.27	1.00	3.67
T2	-1.17	2.17	0.67	1.00
T3	0.67	0.93	1.00	3.00
T4	-0.70	0.07	1.67	2.00
T5	0.23	0.90	0.67	3.33
T6	0.83	1.03	0.67	3.67
T7	-0.17	0.43	1.00	1.67
T8	0.23	1.93	1.33	2.67
T9	0.37	0.80	1.00	1.67
T10	0.77	0.87	1.33	4.00
T11	2.53	1.27	-0.33	3.33
T12	0.27	0.27	1.33	3.67
T13	0.83	0.50	1.33	3.33
T14	1.30	0.27	1.67	6.00
T15	0.13	1.70	1.00	4.00
T16	0.30	1.73	1.33	4.00

CONCLUSIONES

Es ampliamente conocido que los Agaves requieren niveles elevados de reguladores de crecimiento para dar una respuesta morfogenética, por ello, es altamente probable que los niveles utilizados en el presente experimento no hayan sido suficientes para inducir el proceso de morfogénesis, por lo que se sugiere haber aplicado dosis de RCV más altas.

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer de manera especial al Dr. Héctor Gordon Nuñez Palenius, quien a partir de este breve espacio de intercambio de conocimiento, ha despertado en mí persona, la necesidad de seguir profundizando en esta metodología de análisis.

A la Universidad de Guanajuato (UG), por la oportunidad de llevar a cabo esta grata experiencia de tener un acercamiento directo con la investigación.

A Carmen Sanjuana Delgado Ramírez y Rebeca Ramírez Aguilar por el apoyo brindado en laboratorio.

Finalmente al Dr. Derik Castillo Guajardo por su apoyo en el análisis estadístico interpretativo.

REFERENCIAS

- [1] Castro Díaz, A., & Guerrero Beltrán, J. (2013). El agave y sus productos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2), 53-61.
- [2] Ruiz Corral, J. A., Pimienta Barrios, E., & Zañudo Hernández, J. (2002). Regiones térmicas óptimas y marginales para el cultivo de Agave tequilana en el Estado de Jalisco. *Agrociencia*, 36, 41-53.
- [3] Eguiarte Fruns, L. E., & González González, A. (2007). De genes y magueyes estudio y conservación de los recursos genéticos del tequila y el mezcal. *CIENCIAS*, 87, 28-35.

[4] Gerritsen, P. R., Rosales Adame, J. J., Moreno Hernández, A., & Martínez Rivera, L. M. (2011). Agave azul y el desarrollo sustentable en la cuenca baja del río Ayuquila, Costa Sur de Jalisco (1994-2004). *Región y Sociedad*, 23(51), 161-192.

[5] Espino, A. A., Valencia Botín, A., Virgen Calleros, G., Ramírez Serrano, C., Paredes Gutiérrez, L., & Hurtado De la Peña, S. (2012). Micropropagación de Agave (Agave tequilana Weber. var. Azul) a través de yemas axilares. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15, 693-698.

[6] Rosales Maldonado, E., Rodríguez de Francisco, L. E., Alvarado Gómez, O., & Cárdenas Cerda, M. E. (2003). Diseño y construcción de un sistema de inmersión temporal. *Centro Agrícola*, 30(1), 69-72.

[7] Consuegra Navarro, D. M., & Díaz Sánchez, E. (2014). Técnicas de análisis de datos. En A. Molina Collado, & Á. E. Tayala (Ed.), *Investigación de Mercados* (pp.173-200). Madrid, España: ESIC.