

ESTABLECIMIENTO DE *AGAVE TEQUILANA* WEBER VARIEDAD AZUL EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT)

Aguilar Altúzar Eugenia del Rosario (1); Núñez Palenius Héctor Gordon (2)

1 [Ingeniería en Alimentos, Universidad de Guanajuato] | [edr.aguilaraltuzar@gmail.com]

2 [Departamento de Agronomía, División ciencias de la vida, Campus Irapuato-Salamanca] | [palenius@ugto.mx]

Resumen

El *Agave tequilana* Weber variedad azul es una planta perteneciente a las *Asparagáceas*, de gran importancia en el país de México ya que forma parte principal de la materia prima de una de las bebidas más significativas, como lo es el tequila. Este trabajo describe el efecto de la cinetina (CIN) como regulador de crecimiento, para el desarrollo de brotes en esta planta, utilizando un sistema *in vitro* de inmersión temporal (SIT). Se realizaron seis tratamientos con cuatro repeticiones, con 0 mg/L de CIN, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L y 30 mg/L. La cinetina se colocó en el medio MS (Murashigue & Skoog, 1962) con sacarosa, ajustando el pH entre 5.7 y 5.8 en biorreactores en los que posteriormente se añadieron los 24 explantes para cada uno de los tratamientos, las inmersiones se realizaron cada 72 horas durante 6 semanas. En este estudio se evaluó el crecimiento de los explantes así como la obtención de los brotes, dando como resultado que el mejor tratamiento fue el número 4 con 20 mg/L de CIN para la propagación del *Agave tequilana* Weber en un SIT.

Abstract

The *Agave tequilana* Weber var. Azul (blue variety) is a plant belonging to the *Asparagaceae*, of foremost importance in Mexico, as it forms the raw material of one of the most significant drinks as is the tequila. This work describes the effect of kinetin (KIN) as a plant growth regulator, for the development of shoots in this plant, using an *in vitro* temporary immersion system (TIS). Six treatments were performed with four replicates, with 0 mg / L KIN, 10 mg / L, 15 mg / L, 20 mg / L, 25 mg / L and 30 mg / L. The kinetin was placed in the MS medium (Murashigue & Skoog, 1962) with sucrose, adjusting the pH between 5.7 and 5.8 in bioreactors in which the 24 explants were subsequently added for each of the treatments, the immersions were performed every 72 hours for 6 weeks. In this study, we evaluated the growth of the explants as well as obtaining the shoots, resulting in the best treatment was the number 4 with 20 mg/L of CIN for the propagation of the *Agave tequilana* Weber in a TIS.

Palabras Clave

Cinetina (CIN); *Agave tequilana* Weber; Sistema de Inmersión Temporal (SIT).

INTRODUCCIÓN

El *Agave tequilana* Weber Variedad Azul, pertenece a la familia de las *Asparagáceas*, sus principales características son: hojas largas fibrosas, forma lanceolada, color azulado; la parte aprovechable para la elaboración del tequila es la piña o cabeza. Este agave es la única variedad admitida para la elaboración de tequila y debe ser cultivada dentro del territorio con la denominación de origen [1]. La cual comprende 181 municipios ubicados en cinco estados de los Estados Unidos Mexicanos: Jalisco 125 municipios; Guanajuato 7 municipios (Abasolo, Ciudad Manuel Doblado, Cuerámaro, Huanímaro, Pénjamo, Purísima del Rincón y Romita); Michoacán 30 municipios; Nayarit 8 municipios; y Tamaulipas 11 municipios.

El agave no existe en estado silvestre, tarda de 6 a 9 años para llegar a su estado de madurez, contando los dos años que pertenece con la madre antes del desarrollo como una sola planta. Es la edad que ha alcanzado un nivel significativo de carbohidratos fermentables.

La Norma Oficial Mexicana (NOM) para la producción de Tequila especificó que sólo *Agave tequilana* Weber var. Azul se puede utilizar para su elaboración. Como muchas otras plantas de Agave, la piña o la cabeza de *A. tequilana* es muy rica en carbohidratos. A pesar de las muchas limitaciones para usar sólo *Agave tequilana* Weber var. Azul para la producción de Tequila, se pueden hacer dos tipos de la bebida donde se conoce como Agave 100% si solo se usó *Agave tequilana* como fuente de carbohidratos y un tequila mezclado debe tener al menos 51% de *A. tequilana* y el resto de los carbohidratos fermentables podrían provenir de cualquier otra fuente como: azúcar de caña; el maíz; melaza, por mencionar algunos [2].

Cinetina (CIN)

Es probablemente una hormona que no existe de forma natural en las plantas, tiene una estructura relativamente simple y los bioquímicos pronto fueron capaces de sintetizar otros compuestos

similares que se comportan como las citocininas. En la actualidad se han aislado citocininas de muchas especies diferentes de plantas con semilla, principalmente en tejidos de división nativa como los de semillas, frutos y raíces. [3] La cinetina (CIN) promueve la división y la diferenciación celular. Su nombre proviene del término *citocinesis* que hace referencia a la división celular.

Este método utiliza la cinetina para inducir la formación de brotes en crecimiento sobre explantes de *A. Tequilana* Weber var. Azul de las accesiones 35 y 37 de la Colección Nacional de Agaves de la Universidad de Guanajuato y SAGARPA.

Sistema de Inmersión Temporal (SIT)

Este sistema de propagación *in vitro* que consiste en sumergir explantes en una solución con reguladores de crecimiento para la proliferación de brotes.

La eficiencia de este método permite su aplicación en la transformación genética mejorando considerablemente las técnicas actuales de propagación [4].

Hipótesis

Las concentraciones elevadas de CIN aumentarán el crecimiento de brotes en explantes de *Agave tequilana* Weber de la variedad azul.

Objetivo

Determinar cuál es la mejor concentración de CIN para inducir el crecimiento de brotes en el *Agave tequilana* Weber de la variedad azul.

Justificación

Ya que el *A. tequilana* Weber var. Azul es una planta importante para México, por su aportación en la elaboración del Tequila, y que además esta planta tarda hasta 9 años para poder usarla como materia prima en este producto, es importante poder propagarla para evitar su extinción y se pueda seguir produciendo esta bebida.



IMAGEN1: Colección Nacional de agaves UG-SAGARPA
(*Agave tequilana* Weber var. Azul accesiones 35 y 37)

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la propagación de brotes en *A. Tequilana* Weber var. Azul, que se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales de la División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato, se realizó un SIT *in vitro* en el cuál se preparó el medio de cultivo líquido MS (Murashigue & Skoog, 1962) con sacarosa y la adición del regulador de crecimiento Cinetina (CIN) con las concentraciones de la **tabla 1** para seis tratamiento con cuatro repeticiones cada uno, requiriendo así 24 explantes de la colección de agaves de la Universidad de Guanajuato-SAGARPA, de las accesiones 35 y 37, y ajustando posteriormente el pH entre 5.7 y 5.8.

Tabla 1: Concentraciones usadas de CIN para cada uno de los tratamientos con sus respectivas repeticiones

CIN mg/L	Tratamientos	Repeticiones			
		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
0	1	T ₁ R ₁	T ₁ R ₂	T ₁ R ₃	T ₁ R ₄
10	2	T ₂ R ₁	T ₂ R ₂	T ₂ R ₃	T ₂ R ₄
15	3	T ₃ R ₁	T ₃ R ₂	T ₃ R ₃	T ₃ R ₄
20	4	T ₄ R ₁	T ₄ R ₂	T ₄ R ₃	T ₄ R ₄
25	5	T ₅ R ₁	T ₅ R ₂	T ₅ R ₃	T ₅ R ₄
30	6	T ₆ R ₁	T ₆ R ₂	T ₆ R ₃	T ₆ R ₄

Para el SIT se utilizaron biorreactores a base de frascos de vidrio con una capacidad de 413 mL,

los cuales contenían 50 mL del medio MS líquido con CIN, en el interior del envase contenían una rejilla de plástico con 4 cm por lado y de altura, y en ésta se colocaron en la parte superior los explantes, se usaron tapones de huelle No. 6 con una abertura de 0.80 cm de diámetro en el cual se insertó una manguera de silicón rellena de algodón para así tener un sistema con aeración (IMAGEN 2). El material fue esterilizado a 120°C con 1.5 Psi por 20 minutos. Después se llevó a cabo la colocación de los explantes en los biorreactores dentro de una campana de flujo laminar, estas unidades experimentales median entre 4 y 10 cm, y posteriormente se inició la inmersión el 16 de junio cada 72 horas durante 6 semanas, las inmersiones se llevaron a cabo los días 19, 22, 25, 28 de junio y 01, 04, 07, 10, 13, 16, 19 y 22 de julio, para esto se utilizó un soporte metálico de inclinación (IMAGEN 3). Para la obtención de resultados se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio, y las variables a evaluar fueron el crecimiento de brotes (hijuelos) y raíces en cada uno de los tratamientos y también la formación de hojas necrosadas.



IMAGEN2: Biorreactores en el cuarto de crecimiento



IMAGEN3: Biorreactores en el soporte de inclinación

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las inmersiones de los explantes para cada tratamiento se llevaron a cabo durante 6 semanas. Se realizó un análisis de varianza en el cual se estudió la cantidad de hijuelos, raíces, hojas nuevas y hojas necrosadas que induce la cinetina en cada uno de los tratamientos que se llevaron a cabo durante todo este periodo de experimentación (Tabla 2).

Tabla 2: Resultados del análisis de varianza para las variables medias; raíces, hijuelos, hojas nuevas y hojas necrosadas.

Variables analizadas por tratamiento	Cantidad por Tratamiento						Razón-F	Valor-P
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆		
Raíces	7	4	5	6	3	6	0.37	0.8655
Hijuelos	1	0	0	1	0	0	0.80	0.5640
Hojas Nuevas	0	0	0	1	2	3	1.60	0.2106
Hojas Necrosadas	6	8	5	7	2	4	0.63	0.6815

Tabla 3 : Análisis de varianza de la longitud de las raíces desarrolladas en cada tratamiento

Tratamiento	Raíces	Longitud promedio	σ^2	σ	Error
T1	7	1.93 cm	1.2024	1.0965	± 0.414
T2	4	1.55 cm	1.1767	1.0847	± 0.5424
T3	5	2.6 cm	0.925	0.9618	± 0.4301
T4	6	2.37 cm	1.0867	1.0424	± 0.4256
T5	3	2.17 cm	0.0833	0.2887	± 0.167
T6	6	1.8 cm	0.52	0.7211	± 0.2944

Ya que los datos obtenidos de la **tabla 2** el **Valor-P** de la **Razón-F** es mayor que 0.05, en todos los casos, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de cada una de las variables y entre un nivel de Tratamiento y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Al igual que en el estudio de la micropropagación de *agave tequilana* Weber variedad Azul usando como reguladores de crecimiento Ácido Indol Butírico (AIB) y 2Isopentenil-adenina (2iP) [6].

Para poder saber cuál era el tratamiento que nos ayudaría a obtener un mayor número de raíces y con una mayor longitud se realizó otro análisis de varianza en el que nos arroja los resultados de la cantidad de raíces desarrolladas para cada

tratamiento con la longitud de crecimiento durante estas 6 semanas de experimentación (Tabla 3).

Con estos datos podremos concluir cuál será el mejor tratamiento para la micropropagación del *Agave tequilana* Weber var. Azul con cinetina como regulador de crecimiento.

Aunque entre cada tratamiento no exista una diferencia significativa, se analizó con mayor detenimiento el crecimiento de las raíces por lo que se determinó que el tratamiento 1 (0 mg/L) tiene el mayor número de raíces, pero el promedio de crecimiento de estas es muy pequeño (1.93 cm) en comparación con el tratamiento 3 (15 mg/L) (2.6 cm), 4 (20 mg/L) (2.37 cm) y 5 (25 mg/L) (2.17 cm), este último tiene el error más pequeño (± 0.167) aunque la cantidad de raíces (3) lo hace obsoleto.

Por lo que en los tratamientos 3 y 4, el número 4 resulta ser mejor, aunque la longitud promedio sea un poco menor al tratamiento 3 por 0.43 cm, éste desarrolla más raíces y tiene un error menor por (± 0.0045).

CONCLUSIONES

Después de realizar esta experimentación para la micropropagación de *Agave tequilana* Weber con cinetina como regulador de crecimiento, podemos concluir que la mejor concentración es de 20 mg/L ya que se produce un mayor número de raíces con una mayor longitud.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco por la ayuda que me brindaron durante esta investigación al Dr. Héctor Gordon Núñez Palenius, a los técnicos del laboratorio Rebeca Ramírez Aguilar y Claudio Bernardo Padilla González y a mis compañeros Andrés Ambriz Sevilla, María Fernanda Cuazitl y Cedma Madai Chocoteco.

REFERENCIAS

- [1] Andrew G.H. Lea, J. P. (2003). *Fermented Beverage Production*. New York: Springer Science & Business Media.
- [2] CATIE. (1993). *Programa Agricultura Topical Sostenible P.a.t.s. Area de Cultivos Tropicales Biotecnología*. Costa Rica: Bib. Orton IICA .
- [3] González, J. F. (2010). *Ingeniería de Tequilas*. Colombia: Grupo de Investigación en Ingeniería Institucional.
- [4] Peter H. Raven, R. F. (1992). *Biología de las plantas, Volume 2*. Barcelona: Reverte.
- [5] Montejó Guzmán, A. B., Núñez Palenius, H. G (2016). Utilización de un sistema de inmersión temporal (SIT) para multiplicar plantas ornamentales de Agave *Victoriae-Reginae* (T. Moore). *Jóvenes en la ciencia*, vol. 2 (1),1429- 1433.
- [6] Morales González, B., Núñez Palenius, H. G (2016). Micropropagación de Agave tequilana Weber variedad azul "El Coronel" en un Sistema de Inmersión Temporal (SIT). *Jóvenes en la ciencia*, vol. 1 (2), 77-82.
- [7] Delgado Ramírez, C. S., Núñez Palenius, H. G (2015). Establecimiento de Agave (Agave tequilana Weber var. Azul)en un Sistema de Inmersión Temporal (SIT). *Jóvenes en la ciencia*, vol. 1 (2), 54-59.