



MICROPROPAGACIÓN DE AGAVE (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) A TRAVÉS DE YEMAS AXILARES

[MICROPROPAGATION OF AGAVE (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) THROUGH AXILLARY BUDS]

A. Angeles-Espino¹, A. J. Valencia-Botín^{2*}, G. Virgen-Calleros¹,
C. Ramírez-Serrano¹, L. Paredes-Gutiérrez³ and S. Hurtado-De la Peña¹

¹ Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.
Universidad de Guadalajara, CUCBA. Km 15.5 carretera Guadalajara-Nogales, Las
Agujas, Zapopan, Jalisco.

² Centro Universitario de la Ciénega. Universidad de Guadalajara.
Av. Universidad 1115, Ocotlán, Jalisco, México. CP 47820.

³ Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Salazar, Estado de México.
E-mail: botin77@gmail.com
* Corresponding author

SUMMARY

Agave (*Agave tequilana* Weber var. azul), is commonly called, “Blue Agave or Agave Tequilero”. The agave plant is an important economic product of Mexico due to its base ingredient is Tequila, which is a popular distilled spirit. Agave *in vitro* propagation is a new technique to obtain rapid multiplication in a short time. The plant response to hormones must be evaluated for each species of Agave. The objective for this research was to generate agave plantlets from axillary buds by *in vitro* culture. Six month aged plants were brought from the production field. Buds were disinfected with 70% alcohol and 3% sodium hypochlorite for 15 minutes and triple rinsed under aseptic conditions. Explants were cultured in Murashige & Skoog (MS) medium, supplemented with 24.6 μM of AIB and 46.46 μM of Kinetin, sucrose 30 g L^{-1} and agar 8 g L^{-1} . Medium was added at 25 mL per flask and sterilized at 121°C for 15 minutes. One explant per flask was cultured and incubated at 27°C and 16 hours light. The bud induction appears in four weeks after it was cultured and then they were subcultured in MS supplemented with 0.5 μM of AIB and 46.46 μM of Kinetin. The plantlets development was reached at four weeks after the buds induction. Agave micropropagation from auxiliary buds was completed within 10 weeks. The time required to get *in vitro*-plants were demonstrated using the *in vitro* technique propagation. It is an efficient process of mass multiplication to obtain healthy, pathogen free and vigorous plants.

Key words: Axillary buds; blue agave; micropropagation.

RESUMEN

El agave (*Agave tequilana* Weber var. azul), se le conoce comúnmente como “Agave Azul o Agave Tequilero”. La planta de agave es un producto económicamente importante de México debido a que es el ingrediente base del Tequila, el cual es una bebida popular destilada. La micropropagación es una técnica importante para la multiplicación masiva en agave y la respuesta a los reguladores de crecimiento debe considerarse en el desarrollo de cada protocolo. El objetivo del trabajo fue obtener plántulas de agave a partir del cultivo de meristemas *in vitro*. Se colectaron hijuelos de seis meses en plantaciones de 3 años de edad. Los meristemas se lavaron y desinfectaron con alcohol al 70% y una solución de hipoclorito al 3% por 15 minutos y se dio triple enjuague en condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar. Los explantes se sembraron en el medio Murashige y Skoog (MS), suplementado con 24.6 μM de AIB y 46.46 μM de Cinetina, 30 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar para su solidificación. El medio se vertió en frascos de 100 mL de capacidad a razón de 25 mL y se esterilizó en autoclave por 15 min a 121°C. Se sembró un explante por frasco y se colocaron en la cámara de crecimiento a 27°C con 16 horas luz. La inducción de los brotes se presentó a partir de la cuarta semana posterior a la siembra. Los brotes obtenidos se multiplicaron transfiriéndose a medio MS suplementado con 0.1 mg L^{-1} de AIB y 46.46 μM de Cinetina. El desarrollo de las plántulas se obtuvo a la cuarta semana después del inicio de la inducción de los brotes. La micropropagación de plántulas de agave a partir de yemas axilares, se completó en un lapso de 10 semanas a partir de la siembra de los meristemas. Al considerar el tiempo requerido para la obtención de vitroplántulas de agave, se confirmó que la técnica de

micropropagación es un proceso eficiente para la obtención masiva de plántulas sanas, vigorosas y libres de patógenos.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de agave azul tequilero (*Agave tequilana* Weber var. Azul) tiene alta importancia económica y social dada la superficie plantada en la zona de denominación de origen del tequila (DOT) y las familias que dependen de la generación de empleos tanto en campo como en el proceso de industrialización. En los programas de mejoramiento genético, la biotecnología vegetal ofrece herramientas valiosas como la micropropagación *in vitro*, debido a que es un proceso que permite incrementar de una manera significativa y en poco tiempo la producción de vitroplántulas que mantienen las características fenotípicas de la especie y variedad de la que se inicia la multiplicación (González *et al.*, 2004).

Se reportan 197 especies incluidas dentro de los dos subgéneros reconocidos (*Littaea* y *Agaveae*), de las cuáles 136 se encuentran en México, presentando factores que limitan la multiplicación masivamente por métodos convencionales. Una alternativa es la aplicación de las técnicas de propagación y mejoramiento derivadas de la biotecnología vegetal, siendo la micropropagación la que aporta mayores ventajas, ya que 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. Adicionalmente, la biotecnología aporta otras técnicas de propagación que pueden resultar importantes para el mejoramiento y conservación de los agaves (Domínguez *et al.*, 2008a).

Durante los últimos años el cultivo de tejidos ha emergido como una potente herramienta para la propagación de varias especies de agave, de manera directa o indirecta mediante organogénesis (Santacruz *et al.*, 1999).

El agave requiere entre seis a ocho años para que alcance su madurez y pueda llevarse a cabo la industrialización y por consiguiente la obtención del tequila. Además en esta etapa de madurez es cuando la planta emite el vástago floral, mismo que se elimina para evitar la producción de semilla, con la consecuente reducción de la variabilidad genética de la especie; por lo cual dicho cultivo se lleva a cabo mediante propagación vegetativa (González *et al.*, 2004).

Palabras clave: Agave azul; yemas axilares; micropropagación.

La investigación que se ha llevado a cabo en el cultivo del agave azul tequilero se ha enfocado principalmente en los aspectos de nutrición, manejo y establecimiento de las plantaciones, además de algunos problemas fitosanitarios tales como insectos plaga, hongos y bacterias; sin embargo en el aspecto de mejoramiento genético, se puede considerar que no hay estudios suficientes al respecto (CRT, 2005).

Cabe destacar que la biotecnología vegetal además es una herramienta valiosa que permite el mejor aprovechamiento de estas plantas y aseguran al mismo tiempo su conservación (Domínguez *et al.*, 2008a).

Dada la importancia que tiene la biotecnología, el contar con una metodología que provea de individuos en tiempos relativamente cortos, el objetivo del trabajo fue obtener plántulas de agave azul tequilero a partir del cultivo de yemas axilares *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron hijuelos de agave azul tequilero como material biológico, cuyo tamaño osciló entre los 4 y 8 cm (tamaño limón), vigorosos y sin daño por fitopatógenos, procedentes de plantas de dos a tres años de edad. La colecta de los hijuelos se llevó a cabo en predios comerciales de las zonas productoras de agave en los municipios de Tequila, Jalisco ubicado a 20°52'52" latitud norte, 103°49'48" longitud oeste y a 1,189 msnm y el Municipio de Arandas en la zona de los Altos de Jalisco ubicado a 20°41'58" latitud norte, 102°21'57" longitud oeste a 2,049 msnm.

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Botánica y Zoología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias CUCBA de la Universidad de Guadalajara. Los hijuelos se lavaron con agua corriente, se quitaron las hojas exteriores dejando solamente las que rodeaban a la yema. Los meristemos se colocaron en una solución de alcohol etílico al 70% por un minuto y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio al 3% por 20 min. En la cámara de flujo laminar bajo condiciones asépticas se realizó triple enjuague con agua bidestilada estéril. Los explantes se colocaron en cajas de Petri estériles y se retiró el tejido dañado por el tratamiento de desinfección.

Se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 24.6 μM de Ácido Indol Butírico (AIB) y 46.46 μM Cinetina y 8 g L^{-1} de agar para su solidificación. Previo a la esterilización se ajustó el pH a 5.7 ± 0.03 para transferir el medio fundido en dosificaciones de aproximadamente 25 mL en contenedores de 100 mL y se esterilizó en autoclave por 15 min a una presión de 20 lb/pulg² y a temperatura de 121°C.

Se colocaron dos explantes por contenedor, se sellaron, rotularon y se transfirieron a la cámara de incubación a una temperatura de $27^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.

Los explantes que desarrollaron brotes, se transfirieron a medio MS suplementado con 0.246 μM de AIB y 46.46 μM de Cinetina para continuar con la multiplicación. En esta etapa se subcultivaron los brotes cada cuatro semanas, los cuales se dividieron de acuerdo a su desarrollo. Previo a la siembra se tomó una muestra de 30 piñas y se midió la longitud de cada una y se correlacionó con los brotes obtenidos en cada explante. A la tercera semana posterior al desarrollo de brotes axilares se tomó una muestra de 30 plántulas, en las que se contabilizó el número de brotes, el número de hojas por brote y la longitud del brote. Se hizo un análisis estadístico de datos apareados mediante una prueba de "t" para el número de brotes emitidos por explante y el número de hojas por explante. Además, se hizo una regresión lineal simple para determinar el comportamiento entre estas dos variables.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inducción de los brotes se presentó con una coloración verde en el 80% de los explantes, mientras que el 20% restante tuvieron una coloración verde amarillenta y retrasaron el desarrollo de las plántulas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Salazar *et al.* (2009), quien trabajando con *Agave cocui*, reportaron que los explantes que presentaron una coloración verde a partir de la segunda semana después de la siembra, desarrollaron brotes en un 80%, lo cual es consecuencia de las altas concentraciones de citocininas. Estas hormonas se han señalado que incrementan el contenido de clorofila a través de la diferenciación de cloroplastos y por consiguiente la capacidad fotosintética; mientras que aquellos que no desarrollan la coloración verde, presentan una coloración café y se necrosan a partir de la segunda semana, no se recuperan y mueren.

La aparición de los brotes se presentó a partir de la cuarta semana posterior a la siembra, mientras que el

desarrollo se llevó a cabo conforme los explantes fueron cambiando de color, de amarillo crema a verde claro, y luego a verde intenso, lo cual fue un indicador de la inducción y del desarrollo de los meristemos a través de la diferenciación. Este comportamiento posiblemente pueda estar influenciado por factores que determinan el desarrollo de los brotes como pueden ser el explante (genética), el número de yemas presentes en cada explante, así como el vigor y la respuesta al medio de cultivo y la concentración de auxina (AIB) y citocinina (Cinetina), hasta alcanzar la organogénesis completa. El tiempo de inducción concuerda con lo reportado por González *et al.* (2007), quienes trabajaron con henequén (*A. fourcroides*) logrando la inducción de brotes entre 4 a 5 semanas después de la siembra, cuyas plantas expresaron una organogénesis completa.

De acuerdo a los resultados que se presentan en la tabla 1, la inducción de los brotes y el desarrollo de las plántulas, fueron indicadores de la respuesta de los meristemos a la concentración de auxina (AIB) y citocinina (Cinetina) que se aplicaron para promover la organogénesis de los meristemos de agave azul tequilero, desde la inducción de los brotes, hasta que las plántulas completaron la organogénesis. El promedio de brotes fue de 3.67 ± 1.24 con una varianza confiable de acuerdo al coeficiente de variación (6.18%); mientras que el número de hojas tuvo un comportamiento similar con 4.43 ± 1.14 en el mismo lapso. Sin embargo el desarrollo foliar fue superior al de los brotes en 18%. Por otra parte, estos resultados muestran que la inducción de brotes adventicios se relaciona directamente con los meristemos presentes en cada explante, mientras que el desarrollo foliar es una respuesta posterior a la brotación, lo que explica que el desarrollo foliar haya sido estadísticamente superior ($P \leq 0.05$). Además, las diferencias significativas que se presentan en cuanto al número de brotes y de hojas con respecto a la longitud de estos, se explican por el comportamiento de las variables, ya que el número de brotes y de foliolos que se desarrollaron, fue independiente a la longitud que alcanzaron (Figura 1).

En trabajos similares mediante el cultivo de meristemos *in vitro*, Aureoles-Rodríguez *et al.* (2008), trabajaron con maguey bruto (*A. inaequidens* Koch), obtuvieron brotación directa sin formación de callo al utilizar secciones de tallo y yemas axilares, lo que resultó en una respuesta positiva en ambos explantes, además encontraron diferencia significativa en las variables altura de planta y número de hojas con concentraciones de 1 y 3 mg/L de BA.

Tabla 1. Efecto del AIB y la Cinetina en la inducción y desarrollo de plántulas de agave regeneradas *in vitro*, y valores estadísticos de “t” para datos agrupados.

Variable	Media	Desviación estándar	Coefficiente de variación	"t _c "	"t" _{0.05}
Número de brotes	3.67	1.24	6.18%	9.76 ^{1*}	2.05
Número de hojas/brote	4.43	1.14	4.67%	2.12 ^{2*}	2.05
Longitud de brote (cm)	3.48	0.86	4.54%	13.11 ^{3*}	2.05

*Diferencia significativa al 5% de probabilidad. ¹Número de brotes vs. Número de hojas,

²Número de brotes vs. Longitud de brote, ³Número de hojas vs. Longitud de brote.

Como se observa en la figura 1, para número de brotes por explante, el valor mayor (30%) se obtuvo entre 3 y 3.5 brotes promedio por explante, mientras que en número de hojas, el 50% estuvo en un rango de 4 a 4.5 hojas en promedio por explante, lo que concuerda con los valores estadísticos obtenidos, ya que el número de hojas fue 18% superior al número de brotes obtenidos por explante. En el desarrollo de los brotes, el 23% tuvo una longitud menor al valor promedio 3.48 ± 0.86 , el 20% en el rango de la media y el 47% con un crecimiento superior (Figura 1). Estos resultados indican que el crecimiento depende del vigor y de la respuesta particular de cada brote al medio de cultivo.

El cálculo de la correlación entre la longitud (cm) de las piñas y el número de brotes inducidos en cada explante, tuvo un valor de $r = 0.33$, mismo que no fue significativo al 5% de probabilidad, lo que indica que el número de yemas presentes en cada explante fue independiente al tamaño de la piña del hijuelo seleccionado para la micropropagación.

Por otra parte, existió una correlación positiva y altamente significativa al 1% de probabilidad ($r = 0.94$) entre el número de brotes inducidos y el número de hojas que se desarrollaron en estos. El comportamiento de estas variables no fue independiente y se explica por la ecuación: $Y = 0.881 + 1.026$ (número de hojas/brote) (Figura 2). El coeficiente de determinación indicó que el 88% de los cambios en el desarrollo de las hojas, se debieron a cambios que se presentaron en el comportamiento de los brotes.

En el proceso de micropropagación que se estableció, en el cual se obtuvo la organogénesis a partir de la siembra de yemas axilares *in vitro*, intervinieron el medio de cultivo (Murashige y Skog, 1962) y las concentraciones de auxina y citocinina que se utilizaron (24.6 μM de Ácido Indol Butírico (AIB) y 46.46 μM Cinetina), ya que propiciaron la inducción de brotes y el desarrollo de las plántulas.

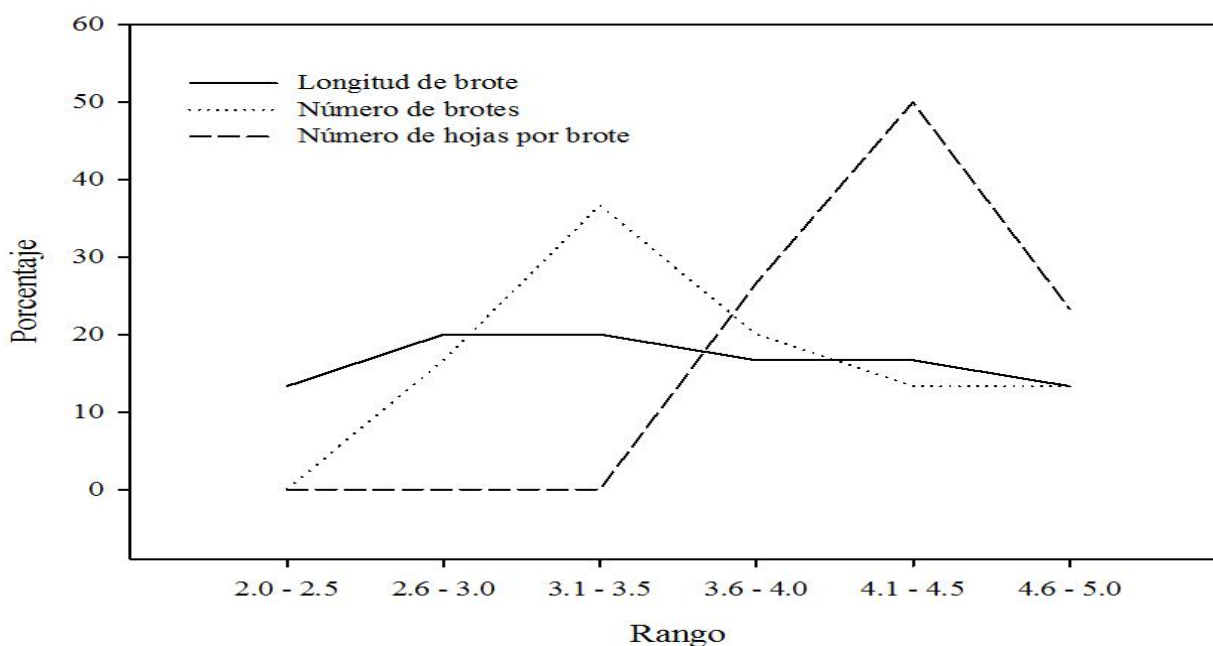


Figura 1. Valores porcentuales de acuerdo a la frecuencia y el valor de clase para número y desarrollo de brotes en *A. tequilana* Weber var. Azul

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Domínguez *et al.* (2008b), quien trabajó con cuatro especies de agave, encontrando que la respuesta a los reguladores de crecimiento difiere de una especie a otra, por lo que es indispensable desarrollar el protocolo de propagación particular para cada una de ellas.

En la figura 3 se muestra el desarrollo de brotes adventicios y la obtención de plántulas *in vitro*. Los

explantes que desarrollaron brotes adventicios presentaron la organogénesis completa, el 90% de los brotes regeneraron en plántulas completas. Las plántulas se transfirieron al medio de cultivo MS suplementado con 0.246 μM de AIB y 46.46 μM de Cinetina obteniendo la multiplicación continua (Schenk y Hilderbrandt, 1972), mismas que conservaron las características fenotípicas de la variedad.

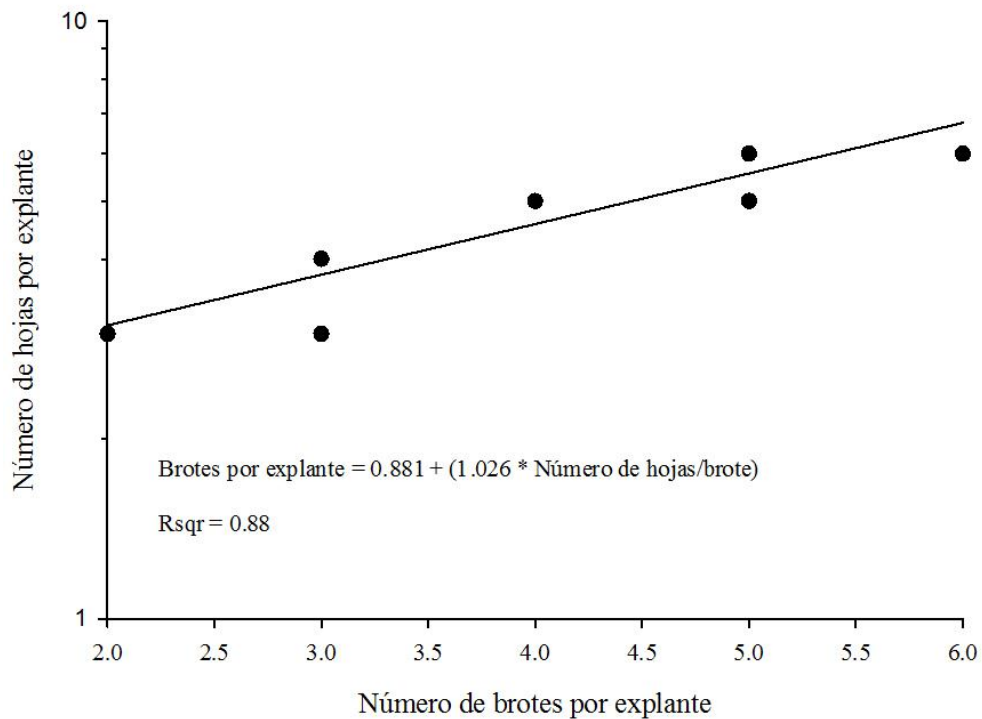


Figura 2. Regresión lineal para número de brotes y hojas por brote en *A. tequilana* Weber var. Azul.

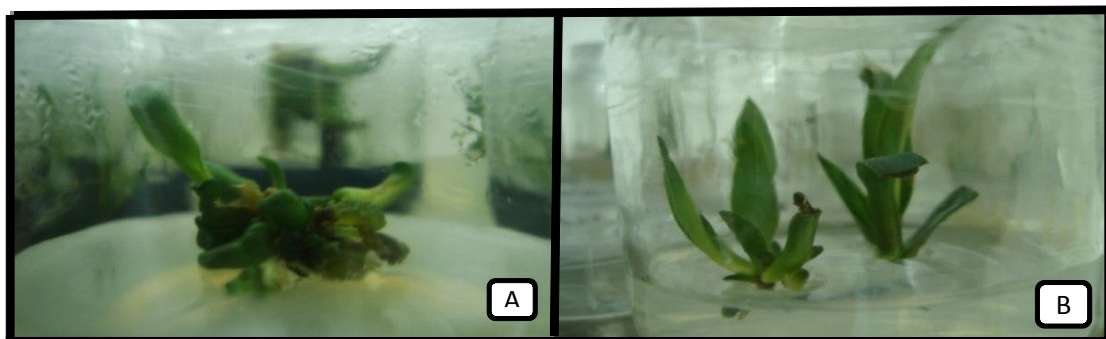


Figura 3. Propagación *in vitro* de *A. tequilana* Weber var. Azul. A) Obtención y desarrollo de brotes adventicios a la sexta semana posterior a la siembra y B) Desarrollo de plántulas.

CONCLUSIONES

La inducción directa de brotes adventicios de *A. tequilana* Weber var. Azul se presentó en la cuarta semana después de la siembra partir de yemas axilares. Las concentraciones de auxina (AIB) y Citocinina Cinetina) utilizadas fueron esenciales para el establecimiento del protocolo en la inducción de brotes adventicios y el desarrollo de la morfogénesis, obteniendo plántulas completas de *A. tequilana* que conservaron las características fenotípicas de la variedad. El protocolo desarrollado puede aplicarse para la micropropagación masiva *in vitro* como una herramienta significativa para los programas de mejoramiento genético en *A. tequilana*.

REFERENCIAS

- Ayala-Escobar, V., Yañez-Morales, M. de J., Braun, U., Groenewald, J. Z. and Crous, P. W. 2005. *Cercospora agavicola* - a new foliar pathogen of *Agave tequilana* var. azul from Mexico. *Mycotaxon*. 93: 115-121.
- Aureoles, R. F., Rodríguez, J. L., Legaria, J. P., Sahagún, J. y Peña, M. G. 2008. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 14: 253-269.
- Consejo Regulador del Tequila (CRT). 2005. Plagas y Enfermedades del *Agave tequilana* Weber var. Azul. Reporte del Comité Técnico Agronómico. Guadalajara, Jalisco. México.
- Domínguez, R. M. S., González, J. M. de L., Rosales, G. C., Quiñones, V. C., Díaz de León, S. D., Mireles, O. S. J. y Pérez, M. B. E. 2008a. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia* 41: 53-62.
- Domínguez, R. M., Alpuche, J. L., Vasco, N. y Perez, E. 2008b. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31: 317-322
- González, G., Alemán, S., Trujillo, R., Keb, M., Abreul, E., Barredo, F., Robert, M. L., Ortiz, R. y Cornides, M. T. 2004. El cultivo *in vitro* como alternativa de la recuperación henequenera (*Agave fourcroydes*) *Biotecnología Aplicada*. 21: 44-48.
- González, H. H., Del Real, J. I. y Solís, J. F. 2007. Manejo de plagas del Agave Tequilero. Colegio de Postgraduados-Tequila Sauza, S.A. de C.V. México. pp. 2-23.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497.
- Salazar, E., González, P. y Hernández, C. 2009. Multiplicación *in vitro* de *Agave cocui* Trelease a través de yemas axilares. *Agronomía Tropical*. 59: 129-135.
- Santacruz, R. F, H. Gutiérrez Pulido y B. Rodríguez G. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 56: 163-167
- Schenk, R. U. and Hildebrandt, A. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50:199-204.
- Nobel, P. S. and Valenzuela, A. G. 1987. Environmental responses and productivity of the CAM plant, *Agave tequilana*. *Agricultural and Forest Meteorology*. 39: 319-334.

Submitted September 09, 2011– Accepted July 06, 2012

Revised received September 11, 2012