



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**“Inducción de Mutantes en Plántulas de Agave (*Agave tequilana* Weber. var. azul) Propagadas *in vitro* y Selección de Genotipos Resistentes al Tizón Foliar (*Cercospora agavicola*)”.**

**Tesis**

**que para obtener el grado de**

**Doctor en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas**

**Presenta**

**Alejandro Angeles Espino**

**Director**

**Dr. Alberto Julián Valencia Botín**

**Co-Director**

**Dr. Gil Virgen Calleros**

Zapopan, Jalisco

27 de Enero de 2014



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Doctorado en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

“Inducción de Mutantes en Plántulas de Agave (*Agave tequilana* Weber. var. azul) Propagadas *in vitro*, y Selección de Genotipos Resistentes al Tizón Foliar (*Cercospora agavicola*)”.

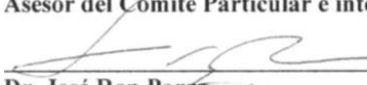
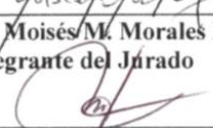
Por

Alejandro Ángeles Espino

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Aprobada por:

 _____ Dr. Alberto J. Valencia Botín Director de Tesis e integrante del Jurado	<u>14-Enero-2014</u> Fecha
 _____ Dr. Gil Virgen Calleros Co-director e integrante del Jurado	<u>14-Enero-2014</u> Fecha
 _____ Dr. Carlos Ramirez Serrano Asesor del Comité Particular e integrante del Jurado	<u>15 de enero de 2014</u> Fecha
 _____ Dr. José Ron Parra Integrante del jurado	<u>ENE 15, 2014</u> Fecha
 _____ Dr. Moisés M. Morales Rivera Integrante del Jurado	<u>15 de Enero de 2014</u> Fecha
 _____ Dra. Lydia C. Paredes Gutiérrez Asesora Lectora de Tesis	<u>15-Enero-2014</u> Fecha
 _____ Dr. Diego R. González Eguiarte Coordinador de la Orientación en Ciencias Agrícolas	<u>15/enero/2014</u> Fecha

## **DEDICATORIA**

A la memoria de mi madre Concepción Espino Espino... Por haberme impregnado el alma de esa fuerza invencible a la que he tenido que recurrir en los días difíciles de mi vida.

A la memoria de mi maestro Raúl Robles Sánchez... Por sus enseñanzas invaluable y por haberme llevado al camino de la ciencia, el trabajo y la honestidad.

A mi esposa Maru, por ser una guerrera invencible, por su apoyo y solidaridad frente a la adversidad y porque en mi camino siempre ha sido un haz de luz, de vida y de esperanza.

A mis hijos José Antonio, Alejandra y León Felipe... Por ser el eje fundamental en la formación de mi vida.

A mi hermano Teódulo... Por su apoyo incondicional y por estar presente en mi vida  
BACÍA, YELMO, HALO...ese es el orden Sancho. León Felipe Camino

A todos aquellos profesionales, que buscan dentro de la ciencia una respuesta a aquello que se presenta como complejo y se ve imposible... pero que tiene solución.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (229211) para la realización de los estudios de Doctorado en Ciencias.

A la Universidad de Guadalajara y al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) por las facilidades otorgadas para la realización de los estudios de Doctorado y el desarrollo del trabajo de investigación.

Al laboratorio de Cultivo de Tejidos del Dpto. de Botánica y Zoología del CUCBA, y en especial al Dr. Carlos Ramírez Serrano por el apoyo y las facilidades brindadas para cubrir la etapa de biotecnología, que fue esencial para el desarrollo de la investigación.

Al laboratorio de Fitopatología del CUCBA y en especial al Dr. Gil Virgen Calleros. por las facilidades para el cultivo, aislamiento y purificación del hongo.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), y en especial a la Dra. Lydia C. Paredes Gutierrez por el apoyo y las facilidades para la irradiación de las plántulas

Al Dr. Salvador Mena Murgía por la beca y las facilidades que se me proporcionaron para la realización del Doctorado.

Al Dr. Enrique Pimienta Barrios por la beca otorgada y haberme brindado el apoyo que estuvo a su alcance para llevar a cabo los estudios de Doctorado.

Al Dr. Salvador Hurtado de la Peña Por haberme motivado y apoyado incondicionalmente para llevar a cabo los estudios de Doctorado.

Mi más sincera gratitud al cuerpo de asesores, Dr. Alberto J. Valencia Botín, Dr. Gil Virgen Calleros, Dr. Carlos Ramírez Serrano y Dra. Lydia C, Paredes Gutiérrez, por su paciencia, orientación y apoyo incondicional durante el desarrollo de la investigación.

Al Dr. José Ron Parra por sus enseñanzas y su contribución al presente trabajo

Al Dr. Moisés Morales por el apoyo y la orientación en el proceso académico.

Al M.C. Pedro Torres por su amistad y haberme acercado al CUCBA

Al M.C. S. Miguel Trejo Luna Herrejón. Por su amistad y apoyo durante el Doctorado.

A quienes fueron mis maestros y contribuyeron a mi formación académica y al desarrollo humano que me permitió culminar los estudios de Doctorado.

## INDICE

	Página
<u>Dedicatoria</u> .....	I
<u>Agradecimientos</u> .....	II
<u>Índice</u> .....	III
<u>Índice de cuadros</u> .....	IV
<u>Índice de figuras</u> .....	V
<u>Resumen</u> .....	1
<u>Abstract</u> .....	2
<u>Introducción</u> .....	3
<u>Hipótesis</u> .....	6
<u>Objetivos</u> .....	7
<u>Capítulo I</u> .....	8
<u>MICROPROGAPACIÓN DE AGAVE (<i>Agave tequilana</i> Weber. var. Azul) A TRAVÉS DE YEMAS AXILARES</u> .....	9
<u>Summary</u> .....	9
<u>Resumen</u> .....	9
<u>Introducción</u> .....	10
<u>Materiales y Métodos</u> .....	10
<u>Resultados y Discusión</u> .....	11
<u>Conclusiones</u> .....	14
<u>Referencias</u> .....	14
<u>Capítulo II</u> .....	15
<u>DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL (DL<sub>50</sub>) CON Co<sup>60</sup> EN VITROPLÁNTULAS DE <i>Agave tequilana</i> var. Azul.</u> .....	16

<u>Resumen .....</u>	16
<u>Summary .....</u>	17
<u>Introducción .....</u>	17
<u>Materiales y Métodos .....</u>	19
<u>Obtención de plántulas <i>in vitro</i> .....</u>	19
<u>Tratamiento de desinfección .....</u>	19
<u>Medio de cultivo .....</u>	19
<u>Siembra de meristemos <i>in vitro</i> .....</u>	19
<u>Obtención de callo embriogénico <i>in vitro</i> .....</u>	20
<u>Medio de cultivo .....</u>	20
<u>Irradiación con rayos gamma Co<sup>60</sup> .....</u>	20
<u>Análisis estadístico .....</u>	21
<u>Resultados y Discusión .....</u>	21
<u>Dosis letal media .....</u>	24
<u>Conclusiones .....</u>	25
<u>Bibliografía .....</u>	26
<u>Capítulo III .....</u>	28
<u>EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN VITROPLÁNTULAS DE <i>Agave tequilana</i></u>	
<u>WEBER VAR AZUL IRRADIADAS CON RAYOS GAMMA CO<sup>60</sup> .....</u>	29
<u>Resumen .....</u>	29
<u>Summary .....</u>	30
<u>Introducción .....</u>	31
<u>Materiales y Métodos .....</u>	32
<u>Material biológico .....</u>	32

<u>Preparación del medio de cultivo .....</u>	<u>32</u>
<u>Siembra de los explantes .....</u>	<u>33</u>
<u>Tratamientos de irradiación .....</u>	<u>33</u>
<u>Variables evaluadas y Análisis estadísticos .....</u>	<u>34</u>
<u>Inducción de callo embriogénico .....</u>	<u>34</u>
<u>Desarrollo de callo .....</u>	<u>34</u>
<u>Desarrollo de embriones somáticos .....</u>	<u>35</u>
<u>Resultados y Discusión .....</u>	<u>35</u>
<u>Inducción de callo embriogénico .....</u>	<u>35</u>
<u>Desarrollo de callo embriogénico .....</u>	<u>38</u>
<u>Desarrollo de embriones somáticos .....</u>	<u>40</u>
<u>Asociación entre longitud y peso de callo .....</u>	<u>42</u>
<u>Conclusiones .....</u>	<u>44</u>
<u>Bibliografía .....</u>	<u>44</u>
<u>Capítulo IV .....</u>	<u>46</u>
<u>EVALUACIÓN NO DESTRUCTIVA DE LA PATOGENICIDAD DE</u>	
<u><i>Cercospora agavicola</i> EN VITROPLÁNTULAS DE <i>Agave tequilana</i></u>	
<u>var. Azul IRRADIADAS CON RAYOS GAMMA Co<sup>60</sup> .....</u>	<u>47</u>
<u>Resumen .....</u>	<u>47</u>
<u>Abstract .....</u>	<u>48</u>
<u>Introducción .....</u>	<u>48</u>
<u>Objetivo .....</u>	<u>50</u>
<u>Materiales y Métodos .....</u>	<u>50</u>
<u>Aislamiento de <i>C. agavicola</i> .....</u>	<u>50</u>
<u>Preparación medio de cultivo .....</u>	<u>50</u>

<u>Purificación de <i>C. agavicola</i> .....</u>	<u>51</u>
<u>Pruebas de patogenicidad .....</u>	<u>52</u>
<u>Obtención de las hojas .....</u>	<u>52</u>
<u>Obtención del inóculo .....</u>	<u>52</u>
<u>Conteo de esporas .....</u>	<u>53</u>
<u>Diseño experimental .....</u>	<u>53</u>
<u>Inoculación .....</u>	<u>53</u>
<u>Resultados y Discusión .....</u>	<u>55</u>
<u>Conclusiones .....</u>	<u>60</u>
<u>Bibliografía .....</u>	<u>60</u>
<u>Conclusiones Generales .....</u>	<u>62</u>
<u>Anexos .....</u>	<u>63</u>
<u>Presentaciones Académicas .....</u>	<u>64</u>
<u>Bibliografía Consultada .....</u>	<u>65</u>



## INDICE DE CUADROS

### Capítulo I

Página

<u>Cuadro 1. Efecto del AIB y la Cinetina en la inducción y desarrollo de plántulas de agave regeneradas <i>in vitro</i>, y valores estadísticos de “t” para datos agrupados.....</u>	12
---	----

### Capítulo II

<u>Cuadro 1. Efecto de la radicación en brotes por plántula, tamaño de plántula y tamaño de callo de <i>A. tequilana</i>.....</u>	22
<u>Cuadro 2. Correlaciones, regresiones lineal y cuadrática para número de brotes, altura de plántula y tamaño de callo, vs. dosis de radiación con Co<sup>60</sup>.....</u>	26

### Capítulo III

<u>Cuadro 1. Número de explantes y valores porcentuales en la inducción de callo embriogénico en tres fechas .....</u>	35
<u>Cuadro 2. Desarrollo promedio de callo embriogénico en cuatro dosis de radiación .....</u>	39
<u>Cuadro 3. Valores promedio para número de embriones somáticos, su longitud y su significancia estadística .....</u>	41

### Capítulo IV

<u>Cuadro 1. Área foliar afectada y porcentaje de infección por <i>C. agavicola</i> en folíolos de vitroplántulas de <i>A. tequilana</i> Weber var. Azul. Irradiadas con Co<sup>60</sup> .....</u>	56
--	----

## INDICE DE FIGURAS

Capítulo I	Página
<u>Figura 1. Valores porcentuales de acuerdo a la frecuencia y el valor de clase para número y desarrollo de brotes en <i>A. tequilana</i> Weber var. Azul.....</u>	12
<u>Figura 2. Regresión lineal para número de brotes y hojas por brote en <i>A. tequilana</i> Weber var. Azul.....</u>	13
<u>Figura 3. Propagación <i>in vitro</i> de <i>A. tequilana</i> Weber var. Azul. A) Obtención y desarrollo de brotes adventicios a la sexta semana posterior a la siembra y B) Desarrollo de plántulas.....</u>	13
 Capítulo II	
<u>Figura 1. Efecto de los rayos gamma sobre vitroplántulas de <i>A. tequilana</i>.....</u>	25
 Capítulo III	
<u>Figura 1. Correlación y regresión entre las dosis de radiación (Gy) y el Número de explantes que presentaron inducción de callo embriogénico .....</u>	37
<u>Figura 2. Correlación y regresión entre las dosis de radiación (Gy) y desarrollo de callo embriogénico.....</u>	40
<u>Figura 3. Correlación y regresión entre dosis de radiación (Gy) y número de embriones.....</u>	42
<u>Figura 4. Correlación y regresión entre el tamaño y el peso de callo.....</u>	43
<u>Figura 5. Proceso de embriogénesis somática indirecta. A. Callo embriogénico. B. Embriones somáticos. C y D. Maduración y conversión en plántulas: 0 Gy (testigo), 10 Gy y 20 Gy .....</u>	43
 Capítulo IV	
<u>Figura 1. A. Cultivo purificado de <i>C. agavicola</i>, B. presencia de cercosporina.....</u>	55
<u>Figura 2. Inoculación de vitroplántulas irradiadas con rayos gamma <i>C. agavicola</i>. A=testigo absoluto inoculado con agua destilada. B=0 Gy inoculado con el hongo. C=5 Gy. D=10 Gy. E=15 Gy. F=20 Gy. G=25 Gy y H=30 Gy.....</u>	58

## RESUMEN GENERAL

La producción de agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) en la zona de denominación de origen (DOT), se ha visto afectada por la incidencia de patógenos, debido a la pobre variabilidad genética del cultivo, ya que se reproduce asexualmente. Por lo tanto una alternativa para generar variabilidad genética es la inducción de mutaciones a través de radiaciones ionizantes con  $\text{Co}^{60}$  por lo que se estableció un protocolo para la obtención de plántulas de agave *in vitro* mediante el cultivo de yemas axilares, para posteriormente irradiarlas con rayos gamma  $\text{Co}^{60}$  a las dosis de 0 (testigo), 10, 20, 30, 40 y 50 Gy para determinar la dosis letal media ( $\text{DL}_{50}$ ). Adicionalmente, se estableció el proceso de embriogénesis somática indirecta a partir de vitroplántulas irradiadas, donde se estudió el comportamiento de las mutaciones inducidas sobre la inducción de callo embriogénico, el desarrollo de los callos durante la etapa de crecimiento, la maduración y germinación, así como la obtención de plántulas. Por otra parte, se establecieron las pruebas de patogenicidad sobre las plántulas irradiadas mediante la técnica de hoja desprendida. Se colectó muestras de tejido enfermo en campo y de ahí se obtuvo el agente causal el cual fue *Cercospora agavicola*. Se cortaron hojas de las plántulas *in vitro* previamente irradiadas, se colocaron en cajas de Petri con papel secante humedecido. Se hizo el conteo de esporas en la cámara Neubauer y se ajustó la concentración a  $20,000 \text{ esporas/mL}^{-1}$ . Se hicieron tres heridas en las hojas, se inocularon y se incubaron por 21 días a  $20^\circ\text{C}$ . En el cultivo de yemas axilares se obtuvieron las plántulas *in vitro* mismas que se multiplicaron. Se implementó el protocolo de embriogénesis somática indirecta a partir de las vitroplántulas irradiadas. En las pruebas de patogenicidad, la lesión ocasionada por *C. agavicola* tendió a disminuir conforme la dosis de radiación se incrementó, lo que sugiere un comportamiento genético aditivo tendiente a una posible resistencia horizontal. Lo anterior debe confirmarse en vivero una vez que las hojas hayan madurado.

Palabras clave: Agave, *Cercospora agavicola*, embriogénesis somática, mutagénesis, rayos gamma y patogenicidad.

## GENERAL ABSTRACT

The agave crop (*Agave tequilana* Weber var. azul) into designation origin area (DOT), has been affected by the occurrence of pathogens due the poor genetic variability of the crop since it reproduces mainly asexually. One option is mutation induction thought  $\text{Co}^{60}$  gamma rays. However the protocol to obtain Agave plantlets from *in vitro* axillary buds culture was established. Then the plantlets were irradiated with gamma rays  $\text{Co}^{60}$  by means of the following doses: 0, 10, 20, 30, 40 & 50 Gy, and determinate median lethal dose ( $\text{LD}_{50}$ ). Indirect somatic embryogenesis process was establishment from irradiated plantlets, determining behaviour embryogenic callus induction, callus development, embryos growth, maturation, germination and plantlets conversion. Pathogenic test were implemented on irradiated plantlets with detached leaf technic. Fungi (*Cercospora agavicola*) was collected in the field from agave diseased leafs and brought to phytopathology laboratory. The fungi was isolated, purified and culture for pathogenic tests. Spore counting was done with New Bauer chamber establishment with only one concentration of 20,000 spores/ $\text{mL}^{-1}$ . Plantlets leafs were cut and injured with needle and placed into petri boxes with wet towel, and were inoculated. Plantlets were obtained from axillary buds *in vitro* culture and multiplied. Indirect somatic embryogenic protocol from irradiated vitroplantlets was established and somatic embrioides and plantlet conversion were obtained. In pathogenic test the injury size caused for *C. agavicola* (leaf gray spot), was less when irradiated dose was increased. These results suggest that additive genetic component is present in resistance behavior, and there is a tendency for a horizontal resistance. This results most be confirmed when plants will be in nursery and leafs are thick and hardened.

Key words: Agave, cell culture, *Cercospora agavicola*, gamma rays, mutants, somatic embryogenic, pathogenic.

## INTRODUCCIÓN

En la clasificación de los centros primarios de origen de las especies cultivadas (Vavilov, 1992), México es considerado como uno de los que abarca una amplia diversidad de muchas especies, entre los que destacan los agaves. No se tiene claro cuántas especies se han documentado actualmente, pero algunos se menciona que se han reconocido entre 166 y 273. En esta nomenclatura, el subgénero *Agave* lo integran 12 secciones con 82 especies, 21 subespecies y 23 variedades con un total de 197 taxas (García, 2007).

Además, el mismo autor consigna que en la familia Agavaceae, el número cromosómico haploide ( $n = 30$ ) y diploide ( $2n = 60$ ), por lo que se consideran organismos paleo poliploides, esto implica que a partir de este número cromosómico se pueden desarrollar poliploides secundarios, es decir, especies con números gaméticos que son múltiplos del número básico actual ( $n = 30$ ).

Dentro de la genética de los agaves, se presenta la característica que se pueden propagar asexualmente lo que representa una adaptación importante para los productores de tequila, ya que se pueden generar plantaciones uniformes, lo que ha sido importante para la producción de azúcares, ya que se tiende a hacer más uniforme la producción. Eguiarte, 2007.

Por su parte, el tequila ha adquirido una alta demanda tanto en el mercado nacional como en los mercados internacionales, además que cuenta con la denominación de origen que obtuvo el gobierno Mexicano en 1977, la cual protege al país como productor y procesador del cultivo utilizado como materia prima para la obtención industrial de ésta bebida, la cual se obtiene del *Agave tequilana* Weber var. azul, siendo la única especie autorizada para la producción del tequila (González, 2007)

El cultivo de *A. tequilana* así como el tequila tienen alta importancia económica y social. El tequila ha sido la bebida más popular y tradicional del país. Sin embargo en cuanto a investigación de las especies se le ha dado poca importancia en comparación a otros cultivos (González, 2007).

La investigación que se ha llevado a cabo en el cultivo del agave se ha enfocado principalmente en los aspectos de nutrición, manejo y establecimiento de las plantaciones con el objeto de tener una producción homogénea en un menor tiempo, además de los problemas

fitosanitarios que se han presentado con diversos insectos plaga, hongos y bacterias; sin embargo en el aspecto de mejoramiento genético, se puede considerar que los trabajos han sido muy pocos o nulos (CRT, 2005).

En este sentido destaca el hecho de que este cultivo requiere de seis a ocho años para alcanzar su madurez y pueda llevarse a cabo la industrialización y por consiguiente la obtención del tequila, además que en esta etapa de madurez es cuando la planta emite el vástago floral, el cual se elimina para evitar la producción de semilla, con la consecuente reducción de la variabilidad genética de la especie; por lo que la reproducción se lleva a cabo mediante procesos vegetativos.

Si bien se han realizado investigaciones a nivel molecular con el objeto de determinar la variabilidad genética que presenta el agave, se ha encontrado que esta es casi nula debido a la forma de reproducción asexual que se lleva a cabo, ya que los hijuelos que de forma natural emite la planta, tienden a ser una copia del genotipo del cual proviene, y solamente la variabilidad se debe a mutaciones espontáneas que se presentan en el tejido somático en forma de quimeras (González, 2007).

Arizaga (2008), menciona que la micropropagación para el establecimiento de plantaciones comerciales dentro de la zona de denominación de origen, parte de la clonación de un genotipo que produce plantaciones homogéneas, aunque se ha reportado variabilidad dentro del género *Agave* a pesar de la propagación asexual (Torres-Morán 2005).

Tomando en cuenta la incidencia de insectos plaga y enfermedades que inciden en el cultivo, la mejor alternativa con que se cuenta actualmente es el establecimiento de un manejo integrado mediante el uso de agroquímicos, biológicos y prácticas culturales, lo cual por una parte incrementa los costos de producción, así como el riesgo que representa el uso indiscriminado de usar sólo agroquímicos, propiciando resistencia a los mismos, además de la contaminación que se genera de una manera directa e indirecta (CRT, 2005).

Dentro de los programas de mejoramiento genético, la inducción de variabilidad se obtiene mediante hibridación en las especies de reproducción sexual, o bien mediante la inducción de mutaciones. Entre las alternativas para las especies de reproducción asexual como el agave, se encuentra la inducción de mutaciones mediante la exposición de tejido somático a radiación

ionizante con el objeto de inducir cambios en el material genético, y obtener mutaciones positivas como una posible fuente significativa para la inducción de variabilidad (Robles, 1986).

Por otra parte, la inducción de mutaciones es una alternativa viable para hacer frente a los problemas fitosanitarios que actualmente se presentan en el cultivo del agave, ya que dentro de la variabilidad que se induce, se obtienen cambios en el material genético, dentro de los cuales existe la probabilidad de obtener plantas con resistencia a enfermedades fungosas como la causada por *Cercospora agavicola* (mancha gris), o bacterianas como la pudrición blanda causada por *Pectobacterium carotovorum*.

Al tomar en cuenta que las mutaciones que se generan en las especies perenes que se propagan de una manera asexual corresponden a cambios en las células somáticas, y por consiguiente no existe recombinación genética; se visualiza por consecuencia una ventaja en el mantenimiento y multiplicación vía cultivo de tejidos, por lo que en poco tiempo se puede disponer de una gran cantidad de plántulas para incorporarlas a las producciones comerciales.

Por otra parte, debe tomarse en cuenta que con el material irradiado se podrían continuar trabajos de investigación orientados a los principales problemas fitosanitarios que se presentan en el agave, e incluso obtener bibliotecas genómicas (cDNA) que permitan identificar genes de interés tales como, los que codifican para la producción de inulinas o madurez.

## **HIPÓTESIS**

La inducción de mutaciones somáticas con Rayos Gamma  $\text{Co}^{60}$  en plántulas de *Agave tequilana* Weber var. azul, es una alternativa para generar cambios en el contenido genético de las células e inducir resistencia al tizón foliar causado por *Cercospora agavicola*.



## OBJETIVOS

### General

Inducir mutaciones somáticas en plántulas de *Agave tequilana* Weber var. azul propagadas *in vitro* a través de Rayos Gamma Co<sup>60</sup> y seleccionar genotipos resistentes al tizón foliar causado por el hongo *Cercospora agavicola*.

### Particulares

- Regenerar plántulas de agave azul tequilero a partir de yemas axilares *in vitro*.
- Inducir mutaciones somáticas en plántulas de agave a través de rayos Gamma Co<sup>60</sup>
- Multiplicar por cultivo de tejidos genotipos mutantes de agave azul tequilero
- Obtener plántulas de agave azul tequilero mediante embriogénesis somática a partir de vitroplántulas sometidas a Rayos Gamma Co<sup>60</sup>
- Seleccionar genotipos resistentes a *C. agavicola* a través de pruebas de patogenicidad *in vitro* en plántulas de agave azul tequilero

## **CAPITULO I**

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

# 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-Espino<sup>1</sup>, A. J. Valencia-Botín<sup>2\*</sup>, G. Virgen-Calleros<sup>1</sup>,  
C. Ramírez-Serrano<sup>1</sup>, L. Paredes-Gutiérrez<sup>3</sup> and S. Hurtado-De la Peña<sup>1</sup>

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

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

<sup>3</sup> 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  $\mu\text{M}$  of AIB and 46.46  $\mu\text{M}$  of Kinetin, sucrose 30 g L<sup>-1</sup> and agar 8 g L<sup>-1</sup>. 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  $\mu\text{M}$  of AIB and 46.46  $\mu\text{M}$  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 meristemos *in vitro*. Se colectaron hijuelos de seis meses en plantaciones de 3 años de edad. Los meristemos 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  $\mu\text{M}$  de AIB y 46.46  $\mu\text{M}$  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<sup>-1</sup> de AIB y 46.46  $\mu\text{M}$  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 meristemos. 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.

**Palabras clave:** Agave azul; yemas axilares;

## 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 cuales 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).

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  $\mu\text{M}$  de Ácido Indol Butírico (AIB) y 46.46  $\mu\text{M}$  Cinetina y 8 g L<sup>-1</sup> de agar para su solidificación. Previo a la esterilización se ajustó el pH a 5.7  $\pm$  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/pulg<sup>2</sup> 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  $0.246 \mu\text{M}$  de AIB y  $46.46 \mu\text{M}$  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 tequileo, desde la inducción de los brotes, hasta que las plántulas completaron la organogénesis. El promedio de brotes fue de  $3.67 \pm 1.24$  con una varianza confiable de acuerdo al coeficiente de variación (6.18%); mientras que el número de hojas tuvo un comportamiento similar con  $4.43 \pm 1.14$  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.

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  $3.48 \pm 0.86$ , 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.

Cuadro 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 <sub>c</sub> "	"t <sub>0.05</sub> "
Número de brotes	3.67	1.24	6.18%	9.76 <sup>1,*</sup>	2.05
Número de hojas/brote	4.43	1.14	4.67%	2.12 <sup>2,*</sup>	2.05
Longitud de brote (cm)	3.48	0.86	4.54%	13.11 <sup>3,*</sup>	2.05

\*Diferencia significativa al 5% de probabilidad. <sup>1</sup>Número de brotes vs. Número de hojas,

<sup>2</sup>Número de brotes vs. Longitud de brote, <sup>3</sup>Número de hojas vs. Longitud de brote.

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 Skoog, 1962) y las concentraciones de auxina y citocinina que se utilizaron (24.6  $\mu\text{M}$  de Ácido Indol Butírico (AIB) y 46.46  $\mu\text{M}$  Cinetina), ya que propiciaron la inducción de brotes y el desarrollo de las plántulas.

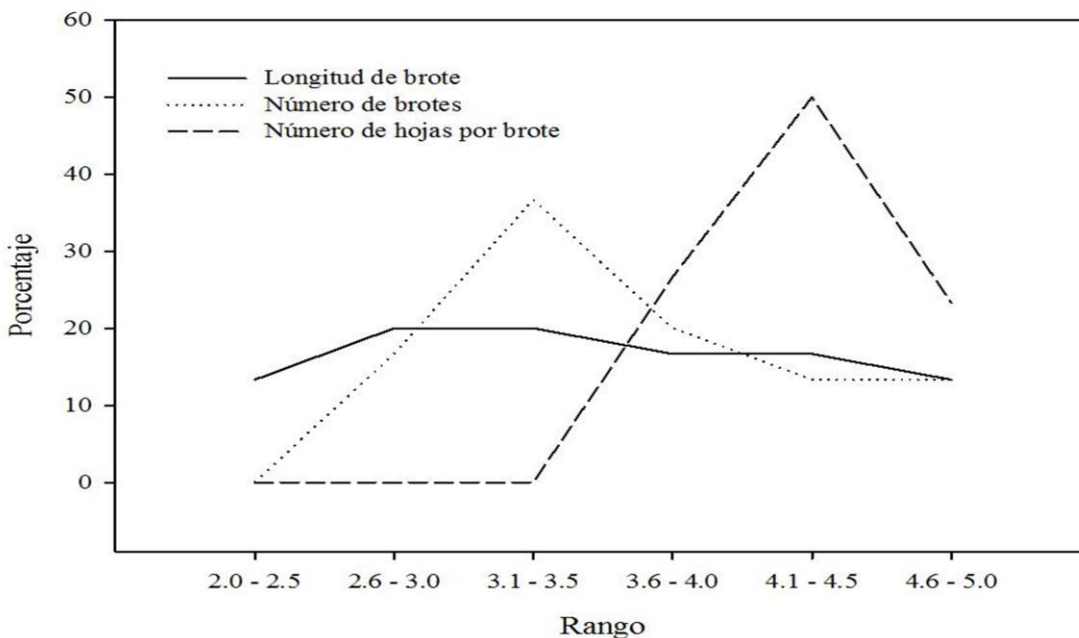


Figura 1. Valores porcentuales de acuerdo a la frecuencia y el valor de clase para número y desarrollo de brotes en *A. tequilana* Weber var. Azul

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  $\mu\text{M}$  de AIB y 46.46  $\mu\text{M}$  de Cinetina obteniendo la multiplicación continua (Schenk y Hilderbrandt, 1972), mismas que conservaron las características fenotípicas de la variedad.

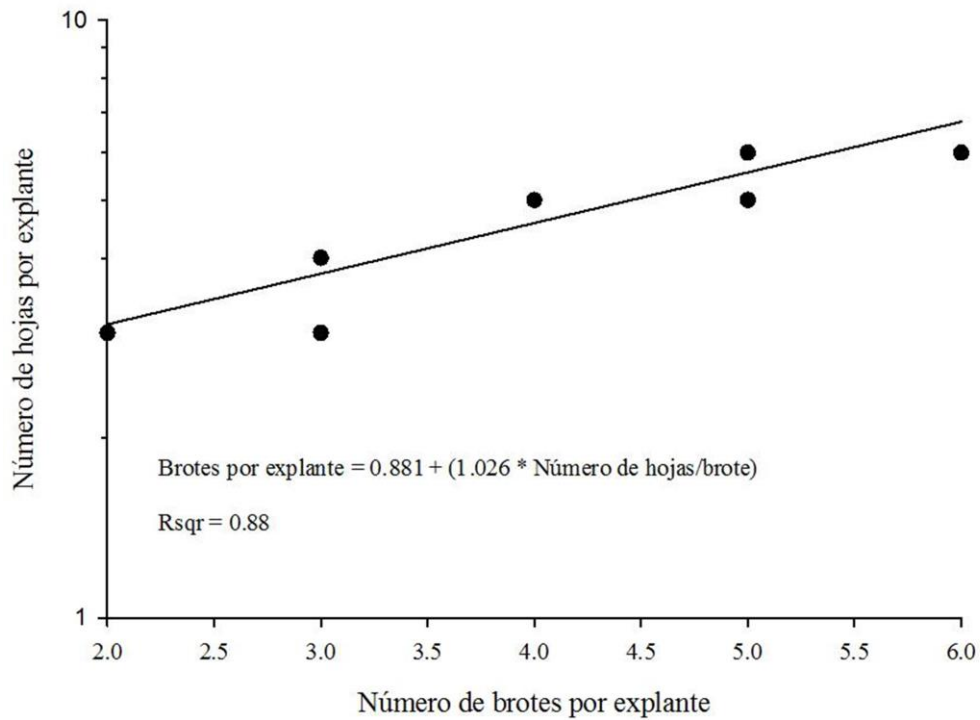


Figura 2. Regresión lineal para número de brotes y hojas por brote en *A. tequilana* Weber var. Azul.

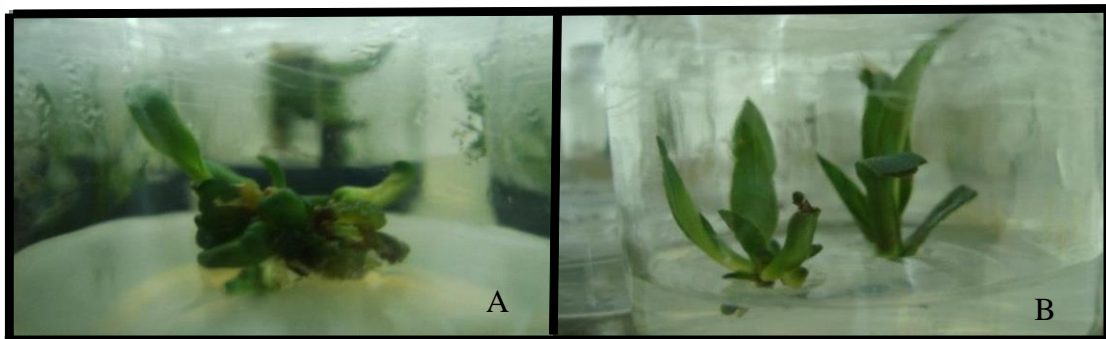


Figura 3. Propagación *in vitro* de *A. tequilana* Weber var. Azul. A) Obtención y desarrollo de brotes adventicios a la sexta semana posterior a la siembra y B) Desarrollo de plántulas.

## CONCLUSIONES

La inducción directa de brotes adventicios de *A. tequilana* Weber var. Azul se presentó en la cuarta semana después de la siembra a 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. Propagación *in vitro* del "maguey bruto" (*Agave Inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico 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. & Valenzuela, A. 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



## **CAPÍTULO II**

**DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL (DL<sub>50</sub>) CON Co<sup>60</sup>**

**EN VITROPLÁNTULAS DE *Agave tequilana* var. Azul**

**DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL (DL<sub>50</sub>) CON Co<sup>60</sup> EN  
VITROPLÁNTULAS DE *Agave tequilana* var. Azul**

**LETHAL DOSIS (LD<sub>50</sub>) DETERMINATION USING Co<sup>60</sup> ON *Agave tequilana* var.  
azul VITROPLANTLETS**

**Alejandro Ángeles-Espino<sup>1</sup>, Alberto J. Valencia-Botín<sup>2\*</sup>, Gil Virgen-Calleros<sup>1</sup>, Carlos Ramírez-Serrano<sup>1</sup>, Lydia Paredes-Gutiérrez<sup>3</sup> y Salvador Hurtado-De la Peña<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Biosistemáticas, Ecología, Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Universidad de Guadalajara. Km 15.5 Carr. Guadalajara-Nogales. Las Agujas, Zapopan, Jalisco. <sup>2</sup>Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 1115. 47820, Ocotlán, Jalisco. <sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Ocoyoacac, Estado de México.

\*Autor para correspondencia (alberto.valencia@cuci.udg.mx)

**RESUMEN**

El cultivo del agave (*Agave tequilana* Weber var. 'Azul') utilizado para producir el tequila tiene importancia económica, cultural y social en México, por la generación de empleos en el campo y la industria, así como el ingreso de divisas resultado de la exportación de esta bebida. La diversidad genética de esta especie es muy baja por lo que una opción de inducir variabilidad genética es vía mutagénesis. El objetivo de la investigación fue determinar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) mediante la irradiación con rayos gamma Co<sup>60</sup> en callos y plántulas de agave obtenidas in vitro, como medio para

generar variabilidad genética. Las plántulas se obtuvieron a partir de yemas axilares promovidas mediante la aplicación de reguladores de crecimiento en el medio Murashige y Skoog (MS). Se irradiaron callos seis semanas posteriores a la inducción y plántulas a las 12 semanas después de la emergencia. En ambos casos las dosis de radiación fueron: 0 (testigo), 10, 20, 30, 40 y 50 Gy. Hubo diferencias significativas tanto en el desarrollo de las plántulas como del callo; ambas estructuras mostraron una disminución significativa en su crecimiento cuando la dosis de radiación fue igual o mayor a los 20 Gy en callos y 30 Gy en plántulas. Los modelos de

regresión lineal y cuadrático entre dosis y variables mostraron ajustes superiores de  $R^2=0.62$  para el primero y de  $R^2 = 0.74$  para el segundo. La  $DL_{50}$  se ubicó entre 20 y 25 Gy para número de brotes y tamaño de plántula y 16 Gy para el área del callo de acuerdo a la regresión cuadrática.

Palabras clave: Agave tequilana, micropropagación, mutaciones, rayos gamma.

### SUMMARY

The agave crop (*Agave tequilana* Weber var. 'Azul') is the source for tequila. It has important social, cultural and economic impacts, particularly on employment needed to fulfill the activities around the crop and industry. Low genetic diversity is present in the cultivar; thus, induction of genetic variability via mutagenesis can be an option. In this research the mean lethal dose ( $LD_{50}$ ) of  $Co^{60}$  gamma rays for inducing genetic variability on agave in vitro callus and plantlets was quantified. Plantlets were obtained by incubating agave explants on a Murashige and Skoog (MS) medium containing growth regulators which promoted growth of axillary buds. Calli were irradiated six weeks after induction and plantlets at 12 weeks of development. In both cases, doses applied were: 0 (control), 10, 20, 30, 40 and 50 Gy. Statistically differences were obtained for plantlets and calli growth; significant effects

appeared at radiation level above 20 Gy for calli and 30 Gy for plantlets. Linear and quadratic regression models between doses and variables were appropriate;  $R^2$  for the linear model was 0.62, while the quadratic model had  $R^2 = 0.74$ .  $LD_{50}$  was fixed between 20 and 25 Gy for plantlets and 16 Gy for callus, based on the quadratic model.

Index words: Agave tequilana, gamma rays, micro propagation, mutations.

### INTRODUCCIÓN

El tequila tiene alta demanda en el mercado nacional e internacional; además cuenta con la denominación de origen que obtuvo el gobierno mexicano en 1977 (González et al., 2007a), la cual protege al país como productor y procesador del cultivo de agave (*Agave tequilana* Weber var. 'Azul'). Según la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-1994, el agave es la única especie autorizada para la producción del tequila (González et al., 2007b).

El cultivo de *A. tequilana*, así como el tequila, tienen importancia económica, cultural y social en México. El tequila ha sido la bebida más popular y tradicional del país, pero la investigación en esta especie ha recibido menor atención que otras especies como gramíneas y hortalizas (González et al., 2007b). Al respecto, es conveniente destacar

que se requieren de seis a ocho años para que la planta alcance la madurez comercial y se pueda efectuar la cosecha o “jima” de la piña (tallo) para la posterior industrialización y obtención del tequila. En esta etapa la planta emite el vástago floral (quiote), el cual se elimina para evitar la disminución de azúcares en la piña, lo que impide la producción de semilla. Esto último reduce la variabilidad genética y obliga a que la reproducción se lleve a cabo mediante estructuras vegetativas.

La incidencia de insectos plaga y fitopatógenos en agave se ha incrementado en la última década, y el control se realiza habitualmente con plaguicidas químicos, biológicos, o con prácticas culturales (González et al., 2007b). La inducción de mutaciones es una alternativa para inducir variabilidad genética, y así incrementar la probabilidad de obtener segregantes con resistencia a enfermedades fungosas, como la mancha gris causada por *Cercospora agavicola*, o bacterianas como la pudrición blanda (*Pectobacterium carotovorum*).

En los programas de mejoramiento genético convencional de especies de reproducción sexual, la inducción de variabilidad genética generalmente se obtiene mediante hibridación y en menor grado por inducción de mutaciones. Entre las opciones para las

especies de reproducción asexual como el agave, la inducción de mutaciones mediante la exposición de tejido somático a radiación ionizante puede provocar cambios en el material genético de las células y así obtener quimeras mutantes (Robles, 1986).

Las mutaciones que se generan en las especies que se propagan asexualmente corresponden a cambios en las células somáticas y, por consiguiente, sin la recombinación genética que ocurre en especies de reproducción sexual. Una opción para mantener y multiplicar a estos tipos de mutantes en especies de multiplicación asexual es el cultivo de tejidos, que a su vez permite que en poco tiempo se disponga de una gran cantidad de plántulas sanas para incorporarlas a las producciones comerciales.

En la inducción de mutantes, los individuos mutantes presentan cambios negativos en una frecuencia creciente conforme aumenta la dosis de radiación, por lo que es importante conocer la dosis letal media ( $DL_{50}$ ). En el caso de semillas, la  $DL_{50}$  corresponde a la cantidad de radiación absorbida con la cual sobrevive 50 % de la población que ha sido expuesta, proporción que se considera como el rango donde se favorece la aparición de mutaciones útiles en los programas de mejoramiento genético (Morela et al., 2002).

En el caso de plántulas, la  $DL_{50}$  o dosis reductiva media ( $GR_{50}$ ) se determina cuando un carácter manifiesta una disminución de 50 % en su expresión con respecto al tratamiento testigo, pues la radicación absorbida provoca cambios en el ADN y origina mutaciones somáticas, mismas que causan alteraciones en la fisiología de la plántula (González et al., 2007a).

El objetivo de esta investigación fue determinar la  $DL_{50}$  al irradiar callos embriogénicos y plántulas de agave (ambos obtenidos *in vitro*) con rayos gamma  $Co^{60}$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo inició con la siembra de tejido meristemático *in vitro* para obtener plántulas, de las cuales se utilizaron secciones de hoja como explantes para producir callos.

### Obtención de plántulas *in vitro*

**Material biológico.** Se utilizaron hijuelos de agave con piñas del tamaño de un limón (4 a 8 cm), vigorosos y sin síntomas de enfermedades, procedentes de plantas de 3 años de edad, colectados en el municipio de Arandas ubicado en la zona de los Altos de Jalisco (20° 41' 58" LN, 102° 21' 57" LO, y 2049 msnm).

**Tratamiento de desinfección.** Los hijuelos se lavaron con agua corriente, y luego se le eliminaron las hojas exteriores para dejar solamente las interiores que rodean al tejido meristemático. Los hijuelos así preparados se desinfectaron en una solución de alcohol etílico a 70 % por 1 min, y posteriormente en una solución de hipoclorito de sodio a 3 % por 20 min, en la cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia. Se enjuagaron tres veces con agua bidestilada estéril, se colocaron en cajas de Petri estériles, y previo a la siembra *in vitro* se retiró el tejido dañado por el tratamiento de desinfección.

**Medio de cultivo.** El medio de cultivo usado para obtener las plántulas *in vitro* fue el MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 24.6  $\mu$ M de ácido indolbutírico (AIB), 46.46  $\mu$ M de cinetina, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 8 g L<sup>-1</sup> de agar para su solidificación. El pH del medio se ajustó a  $5.7 \pm 0.03$ , y luego el medio con el agar fundido se vertió a razón de 25 mL por contenedor, después de lo cual se esterilizaron en autoclave por 15 min a una presión de 1.4 kg cm<sup>-2</sup> y una temperatura de 121 °C.

**Siembra de meristemas *in vitro*.** En la cámara de flujo laminar VECO® (Maryland, USA) bajo condiciones de asepsia, los meristemas apicales se cortaron en secciones

de 0.5 cm de diámetro aproximadamente que constituyeron los explantes, y se sembraron dos explantes por contenedor; los contenedores se sellaron, rotularon y transfirieron a la cámara de incubación a una temperatura de  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. A las 8 semanas de desarrollo las plántulas se transfirieron a recipientes (una plántula por contenedor) para su multiplicación en un medio MS en el que la concentración de AIB se redujo a  $0.5\text{ }\mu\text{M}$  y se mantuvieron las concentraciones de citocinina, que en este caso se cambió a Benciladenina BA ( $44.4\text{ }\mu\text{M}$ ), más sacarosa ( $30\text{ g L}^{-1}$ ) y agar ( $8\text{ g L}^{-1}$ ), como propusieron Soltero et al. (1999; Com. personal)<sup>1</sup>.

### **Obtención de callo embriogénico *in vitro***

**Medio de cultivo y siembra.** Se utilizaron las sales minerales del medio básico MS adicionando con  $13.57\text{ }\mu\text{M}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D),  $8.87\text{ }\mu\text{M}$  de Benciladenina (BA),  $9.27\text{ }\mu\text{M}$  de cinetina,  $30\text{ g L}^{-1}$  de sacarosa y  $8\text{ g L}^{-1}$  de agar. Los callos se indujeron a partir de secciones de hoja de las plántulas obtenidas *in vitro*. Bajo condiciones de asepsia en la cámara de flujo laminar se abrieron los contenedores con las plántulas, se pusieron en cajas de Petri previamente esterilizadas, se cortaron las hojas

y se devolvieron a los contenedores, que luego se sellaron y transfirieron a la cámara de crecimiento. Las hojas se seccionaron en cuadros de  $0.5\text{ cm}^2$  (explantes) y se colocaron seis explantes por contenedor. A la cuarta semana se presentó la inducción de los callos embriogénicos, mismos que se dejaron crecer antes de aplicarles los tratamientos de irradiación.

### **Irradiación con rayos gamma $\text{Co}^{60}$**

En el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) se utilizó un irradiador Gammacell Modelo GO-220® (Ontario, Canadá) para aplicar seis dosis de irradiación: 0 (testigo), 10, 20, 30, 40 y 50 Gy con rayos gamma de  $\text{Co}^{60}$ . La irradiación se llevó a cabo seis semanas después de la inducción de los callos y 12 semanas después de la emergencia de las plántulas.

Posterior al tratamiento de radiación, las plántulas se transfirieron a un medio MS suplementado con  $0.53\text{ }\mu\text{M}$  de ácido naftalenacético (ANA) y  $44.4\text{ }\mu\text{M}$  de Benciladenina (BA) para su multiplicación. Por otro lado, los callos embriogénicos se transfirieron a un medio MS sin reguladores de crecimiento adicionado con  $500\text{ mg L}^{-1}$  de caseína hidrolizada y  $250\text{ mg L}^{-1}$  de glutamina.

## **Análisis estadístico**

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con seis tratamientos y cinco repeticiones. La unidad experimental consistió de una plántula o un callo por repetición (cinco plántulas o cinco callos por tratamiento de radiación). Se hizo análisis de varianza ( $\alpha = 0.01$ ) para altura (cm), número de nuevos brotes de plántulas y área del callo (cm<sup>2</sup>). Se utilizó la prueba de Tukey para la comparación entre medias. Para conocer la magnitud de la respuesta de cada variable a las dosis de radiación, se evaluaron dos modelos de regresión, lineal y cuadrática. Además se hizo un análisis de correlación lineal ( $P \leq 0.01$ ), entre las dosis de radiación como variable independiente (X), y las variables dependientes (Y): inducción de brotes, crecimiento de las plántulas y el área del callo, para determinar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) o dosis reductiva media (GR<sub>50</sub>). Se evaluó la altura de plántula (de la base al ápice de la hoja más grande), número de brotes nuevos y el área de callo (largo x ancho). Las mediciones se hicieron a las seis semanas después del tratamiento de irradiación.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Formación de nuevos brotes, altura de plántula y tamaño de callo

Los análisis de varianza indicaron que las dosis de radiación causaron diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ) en la inducción de nuevos brotes, en la altura de plántula y en el área del callo.

Al analizar el efecto de la radiación absorbida (radio sensibilidad) en la inducción de brotes y la altura de la plántula (Cuadro 1), se encontró que ambas variables no difirieron significativamente ( $P \leq 0.05$ ) entre las plántulas irradiadas con 10 Gy y el testigo, aunque hubo reducción de 19 % en la inducción de brotes y de 5 % en altura. Esto indica que el desarrollo de nuevos brotes es viable cuando las plántulas se someten a esta dosis de radiación, sin afectar el porte de las plántulas.

Al aumentar la dosis de radiación a 20 Gy se detectaron efectos negativos importantes pues el número de brotes por plántula se disminuyó en 42 %, y en 43 % la altura de las plántulas. En las plántulas irradiadas con 30 Gy el efecto de la irradiación fue más severo, pues la inducción de brotes se redujo 65 % y la altura 56 %. Con dosis de 40 y 50 Gy el número de brotes fue estadísticamente similar a 30 Gy y lo mismo sucedió para la altura de las plántulas, excepto que a 50 Gy esta variable disminuyó en 71 %. Estos resultados indican que la inducción de brotes y la altura

de plántula prácticamente se detuvieron a partir de la dosis de 30 Gy.

Al irradiar con Co60 ápices de henequén (*Agave fourcroides* Lemark) cultivados in vitro con dosis de 10 a 50 Gy, González et al. (2007a) encontraron que al incrementar las dosis de radiación a 10, 20 y 30 Gy, el número de brotes por explante se redujo entre 40 y 60 %, con diferencias significativas entre el testigo y esas dosis. La DL<sub>50</sub> se ubicó en este rango por lo que esos autores recomiendan aplicar tales dosis en el mejoramiento in vitro a través de mutaciones. En la dosis de 50 Gy la mortalidad fue de 90 %. Según estos autores, en henequén la reducción del número de brotes

evidenció la ruptura del balance hormonal que permite una buena proliferación, y además de que las variable peso del callo, mortalidad de los explantes y producción de brotes nuevos, resultaron excelentes indicadores de la radio sensibilidad, cuya dosis reductiva media (GR<sub>50</sub>) se ubica entre 20 y 30 Gy.

Otahola et al. (2001) irradiaron explantes de crisantemo (*Dendratherma grandiflorum* Ramat) con dosis de 5 a 20 Gy, y evaluaron su crecimiento a los 7, 14, 21 y 28 d posteriores a la irradiación. Ellos encontraron que a los 7 d no hubo diferencias significativas en el crecimiento entre las dosis de 5 a 15

**Cuadro 1. Efecto de la radicación en brotes por plántula, tamaño de plántula y tamaño de callo de *A. tequilana*.**

Dosis de radiación (Gy)	Brotes por plántula	Tamaño de plántula (cm)	Tamaño de callo (cm <sup>2</sup> )
0	5.20 a	5.82 a	2.65 a
10	4.20 ab (19) †	5.52 a (5)	1.06 b
20	2.60 bc (42)	3.30 b (43)	0.33 c
30	1.80 cd (65)	2.54 cd (56)	0.27 c
40	1.80 cd (65)	2.48 de (57)	0.38 c
50	1.60 cd (69)	1.68 e (71)	0.23 c
Media	2.93	3.56	0.82
DSH <sup>†</sup>	1.81	0.42	0.13

†Valores entre paréntesis corresponden a porcentajes de reducción con respecto al testigo. ††DSH = diferencia significativa honesta. Valores con la misma letra dentro de columna no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).



Gy con respecto al testigo; en las fechas posteriores el mayor crecimiento se obtuvo con 5 Gy, mientras que con la dosis de 20 Gy el crecimiento se redujo en todas las fechas evaluadas. Estos resultados concuerdan con los de *A. tequilana* en que con dosis mayores a 20 Gy el crecimiento disminuye de 43 % a 71 %, mientras que con 10 Gy no difiere del tratamiento sin irradiar.

Lemus *et al.* (2002) evaluaron el efecto de la radiación en la longitud de las plántulas de dos genotipos de *Vigna unguiculata* (L.) Walp a los 7 d después de la siembra, y encontraron diferencias significativas entre dosis absorbidas y entre genotipos, así como en la interacción. Los autores reportaron tres tipos de respuesta: 1) Plántulas altas que correspondieron a las no irradiadas e irradiadas con dosis de 150 Gy; 2) Plántulas de porte intermedio irradiadas con dosis de 300 a 700 Gy para uno de los genotipos; y 3) Plantas pequeñas con dosis de 300 Gy para el otro genotipo. En las plántulas de agave del presente estudio también se formaron tres grupos, los de dosis menores a 20 Gy que no mostraron diferencia con el testigo, un segundo grupo en el que se ubica la dosis reductiva media ( $GR_{50}$ ) entre 20 y 30 Gy, y un tercer grupo con dosis mayores a 30 Gy en las que se detuvo el desarrollo de las plántulas.

En cuanto al efecto de la radiación en el área del callo, desde la dosis más baja el tamaño disminuyó a 1.06 cm<sup>2</sup> a la dosis de 10 Gy (*vs.* 2.65 cm<sup>2</sup> en el testigo) que representa una reducción de 60 %, y a dosis iguales o superiores a 20 Gy la reducción varió entre 88 y 91 %, sin diferencias significativas entre 20 y 50 Gy (Cuadro 1). Estas reducciones se atribuyen a que el callo es un tejido conformado por células embriogénicas con alta capacidad de diferenciación (morfogénesis) y muy susceptibles a los cambios, principalmente cuando se altera el ADN (Freire, 2003).

Según Valdez *et al.* (2004), el crecimiento del callo en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) es afectado por el incremento de la dosis de radiación, ya que el mayor crecimiento de callos se presentó con una dosis de 10 Gy aunque fue significativamente menor que el de los callos no irradiados, y el crecimiento se redujo más a medida que aumentó la dosis de radiación hasta los 30 Gy. Al igual que en el agave del presente estudio, la tendencia del crecimiento se redujo a medida que aumentó la dosis de radiación hasta 30 Gy, y con la dosis de 50 Gy el desarrollo fue muy pobre. García *et al.* (2001) también señalaron que este comportamiento se relaciona con el efecto fisiológico y citológico que producen las irradiaciones en

las células. En caña de azúcar también se encontraron diferencias entre cultivares ('U-Thong 1' y 'Q83') en la resistencia a la radiación con rayos gamma, en cuanto a la formación de callo y regeneración de plantas (Ngampongsai *et al.*, 1992). En el presente estudio, el aumento en la radiación tuvo un efecto negativo en el comportamiento de las células embriogénicas de los callos de *A. tequilana*.

Se conoce que el contenido de humedad y de oxígeno presente en los callos incrementa la susceptibilidad de las células a las mutaciones ocasionadas por la radiación acumulada en cada dosis (IAEA, 1977), lo que aunado a que genéticamente las células embriogénicas tienen una estructura bipolar, se esperarían cambios en el ADN al perder la capacidad de diferenciación que las caracteriza (Freire, 2003). Esto explicaría los altos índices de decaimiento que aquí se registraron en *A. tequilana*, aun en las dosis de 10 y 20 Gy. Resultados similares reportó Rodríguez<sup>1</sup>, quien trabajó con callos embriogénicos de *A. tequilana* y encontró que a dosis mayores a 45 Gy se detuvo el crecimiento, y no encontró respuesta de los callos en la inducción de embriones.

### **Dosis letal media**

La  $DL_{50}$  se determinó mediante análisis de regresión entre las dosis establecidas (de 0 a 50 Gy) y la inducción de brotes, altura de plántula y desarrollo de callo, y los mejores ajustes ( $R^2$ ) se obtuvieron con los modelos lineal y cuadrático (Cuadro 2).

Se obtuvo una correlación negativa y altamente significativa entre las dosis de  $Co^{60}$  y las variables evaluadas, lo que indica que la radiación absorbida produjo mutaciones en el ADN de las células y alteró su desarrollo normal conforme la dosis se incrementó.

La  $DL_{50}$  o  $GR_{50}$  se determinó a través de regresión lineal y regresión cuadrática. En brotes por planta se encontró diferencia de 5.9 Gy, 2.6 Gy para altura de plántula y 7.9 Gy para el área del callo; lo que indica que ambos modelos resultaron eficientes para determinar la  $DL_{50}$ . Sin embargo, el modelo cuadrático fue el que mejor se ajustó (mayor  $R^2$ ) para simular el efecto de la radiación conforme ésta se incrementó.

La mayor diferencia se obtuvo en el área del callo debido a que es una estructura conformada por células competentes que generan estructuras bipolares (embriones), atribuible a que la radiación probablemente indujo cambios en este patrón al modificar la totipotencia celular (Freire, 2003). En altura

de plántula los modelos reportaron prácticamente el mismo valor, pero en número de brotes la diferencia fue de 25 %.

De acuerdo con los resultados, las dosis de radiación que deben aplicarse a explantes de agave propagados *in vitro* para inducir variabilidad, se ubican entre 20 y 25 Gy para plántulas y de 15 a 25 Gy para callos, debido a que en estas dosis se incrementa la probabilidad de inducir mutaciones favorables para fines de selección y mejoramiento genético (Morela et al., 2002). Estos resultados coinciden con los reportados por González et al. (2007a), quienes aplicaron dosis de 10 a 50 Gy a brotes apicales de henequén micropropagados, y reportaron una dosis letal media de 30 Gy para la producción de nuevos brotes axilares y de 20 Gy para la disminución en el peso fresco de callo. En

callos de papa (*Solanum tuberosum* L.), Novisel *et al.* (2007) reportaron que la dosis de 10 Gy corresponde a la  $DL_{50}$  para la inducción de variabilidad genética como parte del programa de mejoramiento genético.

## CONCLUSIONES

Las dosis de radiación absorbidas tuvieron efecto directo en el desarrollo de las plántulas y en el desarrollo de callo, pues ambas variables presentaron altos índices de reducción con dosis superiores a 30 Gy. La  $DL_{50}$  se ubicó entre 20 y 25 Gy para la inducción de brotes adventicios y altura de plántula, y de 15 a 25 Gy para callo. Por tanto, las dosis de radiación para inducir variabilidad en plántulas de agave propagadas *in vitro* deben ubicarse de 15 a 25 Gy para favorecer la aparición de mutaciones favorables.



Figura 1. Efecto de los rayos gamma sobre vitroplántulas de *A. tequilana*

**Cuadro 2. Correlaciones, regresiones lineal y cuadrática para número de brotes, altura de plántula y tamaño de callo, vs. dosis de radiación con Co<sup>60</sup>**

	Brotes por plántula	Altura de plántula (cm)
Correlación lineal “r”	- 0.78**	- 0.94**
Valor crítico	P = 0.001	P = 0.001
Ecuación de regresión lineal	Y = 4.80 – 0.072X; R <sup>2</sup> = 0.62%	Y = 5.741 – 0.087X; R <sup>2</sup> = 0.88
Ecuación de regresión cuadrática	Y = 5.34 -0.15X+0.0015X <sup>2</sup> ; R <sup>2</sup> = 0.75	Y = 6.10 -0.14X+0.0011X <sup>2</sup> ; R <sup>2</sup> = 0.92
DL50 (Gy) lineal	25.9 Gy	24.9 Gy
DL50 (Gy) cuadrática	20.0 Gy	22.3 Gy
	Área de callo (cm <sup>2</sup> )	
Correlación lineal “r”	- 0.79**	
Valor crítico	P = 0.001	
Ecuación de regresión lineal	Y = 1.832 – 0.041X; R <sup>2</sup> = 0.62	
Ecuación de regresión cuadrática	Y = 2.46 -0.13X+0.0019X <sup>2</sup> ; R <sup>2</sup> = 0.84	
DL50 (Gy) lineal	24.8 Gy	
DL50 (Gy) cuadrática	16.9 Gy	

\*\* Diferencias altamente significativas a P ≤ 0.05

**Recibido: 3 de Julio del 2012**

**Aceptado: 13 de Junio del 2013**

### BIBLIOGRAFÍA

Freire, S. (2003) Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Biot. Veg. 3 :195-209.

García, L. R., P. Orellana, L. García, J. Pérez, V. Rodríguez, I. Bermúdez, J. Clavero y C. Romero (2001) Empleo de la mutagénesis en la mejora al grosor del

tallo del somaclón IBP 89-169 de caña de azúcar. Biotec. Veg. 2:71-75.

González, G. S., M. Alemán, R. Garriga, C. de la Fe (2007a) Radio sensitivity to gamma rays (60Co) in shoot tips of henequen. Biotec. Veg. 7:115–117.

González, H., J. Del Real, y J. Solís (2007b) Manejo de Plagas del Agave Tequilero. Ed. Colegio de Postgraduados y Tequila Sauza, S.A de C.V. 123 p.

- IAEA, International Atomic Energy Agency (1977) Manual of Mutation Breeding. 2nd. ed. Vienna, Austria. 288 p.
- Lemus, Y., N. Méndez, J. Cedeño, V. Otahola (2002) Radio sensibilidad de dos genotipos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) a radiaciones gamma. Rev. Cient. UDO Agríc. 2:22-28.
- Morela, F., V. González y L. Castro (2002) Efecto de la radiación Gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos. Agron. Trop. 52:311-323.
- Murashige, T. and F. Skoog. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497
- Ngampongasai, S. W. Sriphisut and P. Sruiyapan. (1992) Use of radiation and tissue culture techniques to induced mutation in sugarcane. In: Research Report Buri Field Crops Research Center. Dept. of Agriculture. Suphan Buri, Thailand. pp:133-143.
- Novisel, V, L R García, I Bermúdez, P Orellana, Y Padrón, D. Torres (2007) Efecto de las radiaciones gamma sobre callos de papa var. ‘Desirée’. Biotec. Veg. 7:57-61.
- Otahola, G. V., M. Aray y A. Yira (2001) Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* (Ram) Tzevelev) mediante radiaciones gamma. Rev. Cient. UDO Agríc. 1:56-63.
- Robles, S. R. (1986) Genética Elemental y Fitomejoramiento Práctico. 1ª ed. Ed. Limusa Wiley. 475 p.
- Valdez, B A, P. Orellana, N. Veitía, y D. Torres. (2004) Crecimiento, regeneración y radiosensibilidad de callos de caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido var. “SP 70-1284”) tratados con radiación gamma fuente  $^{60}\text{Co}$ . Biotec. Veg. 4:165-169.

### **CAPÍTULO III**

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN VITROPLÁNTULAS DE *Agave tequilana* WEBER VAR.  
AZUL IRRADIADAS CON RAYOS GAMMA CO<sup>60</sup>

**EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN VITROPLÁNTULAS DE *Agave tequilana* WEBER  
VAR AZUL IRRADIADAS CON RAYOS GAMMA CO<sup>60</sup>**

**SOMATIC EMBRYOGENESIS ON VITROPLANTLETS OF *Agave tequilana* WEBER VAR  
AZUL IRRADIATED WITH CO<sup>60</sup> GAMMA RAYS**

**A. Angeles-Espino<sup>1\*</sup>, C. Ramírez-Serrano<sup>1</sup>, A. J. Valencia-Botín<sup>2</sup>, G. Virgen-Calleros<sup>1</sup>,  
L. Paredes-Gutiérrez<sup>3</sup> and S. Hurtado-De la Peña<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup> *Centro Universitario de la Ciénega. Universidad de Guadalajara.  
Av. Universidad 1115, Ocotlán, Jalisco, México. CP 47820.*

<sup>3</sup> *Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Ocoyoacac, Estado de México.*

*E-mail: [aangeles\\_1305@hotmail.com](mailto:aangeles_1305@hotmail.com)*

*\* Corresponding author*

**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. El objetivo de la investigación fue obtener embriones somáticos a partir de plántulas irradiadas con rayos gamma Co<sup>60</sup>. Las plántulas se obtuvieron a partir de yemas axilares promovidas mediante la aplicación de reguladores de crecimiento en el medio Murashige y Skoog (MS) y la inducción de callos con la adición de 2,4-D, BA y Citocinina. Las plántulas se radiaron a las 12 semanas posteriores a la emergencia con rayos gamma Co<sup>60</sup>. Las dosis fueron 0 (testigo), 10, 20 y 30 Gy. Hubo diferencia significativa en la inducción de callo embriogénico, desarrollo y obtención de embriones somáticos, los que disminuyeron conforme se incrementaron las dosis de radiación. Estos resultados indican que la disminución en las variables evaluadas se debió a las mutaciones que generó la radiación aplicada en las dosis de 10 y 20 Gy, porque en dosis mayores la inducción de callo embriogénico se inhibió. La regresión confirmó el comportamiento negativo del incremento de la radiación, y una relación positiva entre el diámetro y el peso de callo ( $r = 0.93$ ). Se implementó el

protocolo para la obtención de embriones somáticos a partir de plántulas de agave irradiadas con 10 y 20 Gy.

**Palabras clave:** Agave, cultivo de tejidos, embriogénesis somática mutagénesis.

## 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. Plantlets were obtained by incubating agave explants on a Murashige and Skoog (MS) medium containing growth regulators which promoted growth of axillary buds, and callus induction adding 2,4-D, BA and Kinetin. Plantlets were irradiated 12 weeks after emergence and irradiated with gamma rays  $Co^{60}$  to 0 (control), 10, 20 and 30 Gy. Statistic difference was present when doses were increased, reducing embryogenic callus induction, callus development and somatic embrioides. The results indicate that the decrease in the evaluated variables due to mutation with 10 and 20 Gy, why dose was increase, induction embryogenic callus was inhibited. Negative. Regression confirmed negative behavior when dose radiation was increased, and positive relationship was present between callus weight and size callus reduction ( $r = 0.93$ ). The protocol to obtained somatic embrioides was implemented from plantlets irradiated with 10 and 20 Gy.

Key words: Agave, cell culture, mutants, somatic embryogenic



## INTRODUCCIÓN

Aun cuando el agave tequilero ha sido cultivado durante más de dos siglos en el estado de Jalisco, continúan las metodologías de cultivo poco tecnificadas para mejorar la producción. No se utiliza el mejoramiento genético mediante la vía sexual para encontrar variación en la progenie. Por otra parte, la propagación asexual durante muchos años ha ocasionado un incremento en la clonación de los pocos genotipos seleccionados disminuyendo la variación dentro de las plantaciones, lo que ha ocasionado la incidencia y proliferación de enfermedades. (Rodríguez, G., 1995).

El mismo autor consigna que el mejoramiento genético convencional en *Agave tequilana* se dificulta por ser semépala, el ciclo de vida (6 a 12 años), tiempo corto de floración y la dificultad para manipular la floración. Por lo que debe adaptarse a las formas de reproducción de la especie y hacer uso de las nuevas tecnologías como el cultivo *in vitro* y la embriogénesis somática y explotar al máximo la variabilidad genética que lleve a seleccionar individuos con mejores características agronómicas e industriales.

Si bien es cierto que se han realizado investigaciones a nivel molecular con el objeto de determinar la variabilidad genética que presenta el agave, se ha encontrado que esta es poca variable debido a la forma de reproducción asexual que se lleva a cabo, ya que los hijuelos que de forma natural emite la planta, tienden a ser una fenocopia del genotipo del cual proviene, y solamente la variabilidad se debe a mutaciones espontáneas que se presentan en el tejido somático en forma de quimeras (González, 2007).

Arizaga, 2008, menciona que la micropropagación para el establecimiento de plantaciones comerciales dentro de la zona de denominación de origen, parten de un solo código genético que produce plantaciones homogéneas a partir de una sola célula somática, aunque se ha reportado variabilidad dentro del género *Agave* a pesar de la propagación asexual (Torres-Morán 2005).

La embriogénesis somática es una técnica de cultivo *in vitro*, de interés por sus aplicaciones potenciales en propagación clonal, transformación genética y estudios de desarrollo de embriones. Esta biotecnología ha sido ampliamente usada en plantas de interés económico y se presenta también como una alternativa para la obtención de material vegetal de algunos forestales. La embriogénesis somática es un sistema que permite obtener clones con una arquitectura dimórfica

normal y un sistema radical de gran anclaje, además de los otros potenciales que esta técnica presenta para el mejoramiento genético, intercambio y conservación de material (Medina *et al.*, 2007).

Rodríguez-Garay *et al.* (1996) y Martínez-Palacios *et al.* (2003) reportaron embriogénesis somática en *A. victoria-reginae* Moore, a partir de explantes de hoja y segmentos de tallo. Por su parte, Santacruz-Ruvalcaba *et al.* (1999) lograron la propagación *in vitro* de *A. parrasana* Berger a través de brotes axilares.

La importancia de la presente investigación, se basa en el establecimiento de un protocolo mediante el cual se lleve a cabo el proceso de embriogénesis somática indirecta en vitroplántulas de agave azul tequilana sometido a bajas dosis de radiación ionizante que permitan obtener plántulas con características particulares, debido a que las mutaciones que se inducen en una célula, darán origen a un genotipo diferenciado en caracteres específicos conservando las características fenotípicas de la variedad.

El objetivo de la investigación fue establecer un protocolo de embriogénesis somática para obtener plántulas de *Agave tequilana* Weber var. azul a partir de vitroplántulas irradiadas con Rayos gamma  $Co^{60}$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Se utilizaron como explantes secciones de hoja procedentes de vitroplántulas obtenidas a partir de yemas axilares.

### Preparación del medio de cultivo

Se seleccionó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado con vitaminas, nitrógeno reducido adicionando con 13.57  $\mu\text{M}$  de Acido 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D), 8.87  $\mu\text{M}$  de Benciladenina (BA), 9.27  $\mu\text{M}$  de Cinetina, 30 g  $\text{L}^{-1}$  de sacarosa como fuente de carbohidratos y 8 g  $\text{L}^{-1}$  de agar para su solidificación. (Soltero *et al.*, 1999).

Previo a la esterilización y a la adición del agar, se ajustó el pH a  $5.7 \pm 0.03$  para posteriormente transferir el medio fundido en dosificaciones de aproximadamente 25 mL en contenedores de 100 mL. El medio se esterilizó en autoclave por 15 min a una presión de  $1.4 \text{ kg/cm}^2$  ( $20 \text{ lb/pulg}^2$ ) a una temperatura de  $121 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **Siembra de los explantes**

Se omitió el tratamiento de desinfestación de las plántulas, ya que estas se encontraban en condiciones asépticas en contenedores sellados con medio de cultivo MS. Los frascos con las vitroplántulas se llevaron a la cámara de flujo laminar para la obtención de los explantes. Se extrajeron las plántulas de los contenedores y se colocaron en cajas de Petri previamente esterilizadas en autoclave bajo las mismas condiciones del medio de cultivo. La siembra se realizó en cámara de flujo laminar (VECO, U.S.A.) bajo condiciones de asepsia.

Se seleccionaron las hojas más jóvenes y se colocaron en cajas de Petri previamente identificadas de acuerdo al tratamiento correspondiente a las dosis de radiación. Las plántulas se colocaron nuevamente en medio MS adicionado con  $0.53 \text{ } \mu\text{M}$  de Ácido Naftalenacético (ANA) y  $44.4 \text{ } \mu\text{M}$  de Benciladenina (BA) para continuar con su desarrollo y multiplicación.

Las hojas se seccionaron en cuadros de 5 mm de diámetro aproximadamente. Se sembraron tres frascos por tratamiento colocando seis explantes por contenedor, se sellaron, rotularon y se transfirieron a la cámara de incubación a una temperatura de  $27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad.

### **Transferencia para maduración**

Los callos una vez que alcanzaron la etapa globular (28 días) se transfirieron a medio MS sin reguladores de crecimiento, adicionado con  $50 \text{ mg/L}^{-1}$  de caseína hidrolizada y  $250 \text{ mg/L}^{-1}$  de glutamina para la maduración de los embriones somáticos.

### **Tratamientos de radiación**

Las vitroplántulas se irradiaron con rayos gamma  $\text{Co}^{60}$  con: 0 (testigo), 10, 20 y 30 Gy considerando que la dosis letal media ( $\text{DL}_{50}$ ) se ubica entre 20 y 25 Gy (Capítulo 2) que es donde se incrementa la probabilidad de inducir mutaciones positivas (Morela, 2002).

## **VARIABLES EVALUADAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

### **Inducción de callo embriogénico**

Se diseñó un experimento simple con una distribución completamente al azar con cuatro tratamientos (0, 10, 20 y 30 Gy) y tres repeticiones. La unidad experimental consistió de tres frascos (uno por repetición) por cada tratamiento de radiación, y se colocaron seis explantes en cada uno. La toma de datos se realizó a los 14, 21 y 28 días posteriores a la siembra de los explantes.

Se registraron los explantes en los que se indujo callo embriogénico en la primera fecha. Para la segunda fecha se registraron la aparición de callo embriogénico en nuevos explantes y de igual manera para la tercera fecha. El análisis se realizó con el total de explantes que indujeron callo a los 28 días, se procesaron por análisis de varianza ( $\alpha = 0.01$ ) y se hicieron comparaciones ortogonales para determinar la diferencia entre tratamientos.

### **Desarrollo de callo**

El experimento se montó en un diseño completamente al azar con seis repeticiones. La toma de datos se llevó a cabo en dos explantes por contenedor, en los que se muestrearon dos callos. Se dio seguimiento a partir de la inducción a los 14 días posteriores a la siembra y se hicieron dos mediciones adicionales a los 21 y 28 días, debido a que se transfirieron a medio MS sin reguladores del crecimiento para su maduración. La unidad experimental estuvo conformada por un callo por repetición, al que se le dio seguimiento en las tres mediciones que se llevaron a cabo.

La longitud de los callos se midió con un vernier al considerar la parte más ancha siguiendo la longitud del explante sobre el contenedor. En la segunda y tercera medición, se le restó el tamaño de la medición anterior. El seguimiento estadístico fue igual que en la inducción mediante análisis de varianza y comparaciones ortogonales para la diferencia entre tratamientos. Además se obtuvieron los componentes de regresión, así como la correlación entre las dosis y el tamaño de callo. Con el objeto de determinar efectos de análisis tanto estadístico como del desarrollo de los callos, se tomó una muestra de 15 callos que se oxidaron y no se presentó la inducción de embriones somáticos. Se pesaron (mg), se estimó la longitud (cm) y se hizo un análisis de correlación entre el peso de los callos y la longitud, con el objeto de determinar si estadísticamente las medidas son equivalentes.

## Desarrollo de embriones somáticos

En los explantes que indujeron y desarrollaron callo embriogénico, se contabilizaron los embriones que se obtuvieron, manteniendo el diseño experimental con los tres tratamientos y seis repeticiones. Se realizó el análisis de varianza y los tratamientos se compararon mediante componentes ortogonales, además de obtener el análisis de correlación y regresión lineal simple para determinar el efecto que tuvieron las dosis de radiación y la relación que presentaron con los embriones obtenidos, así como el desarrollo que estos tuvieron.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Inducción de callo embriogénico

La inducción de callo embriogénico se presentó en la segunda semana posterior a la siembra en 11 de los 18 explantes, que corresponde al 61% en el testigo, mientras que en los tratamientos irradiados con 10 y 20 Gy, la inducción se presentó en el 27 y 22% de los explantes, respectivamente. El comportamiento es un indicador del efecto que tuvo la radiación absorbida sobre el tejido somático de las plántulas, que se detalla más adelante de acuerdo a los análisis estadísticos que se realizaron. En la dosis de 30 Gy, los explantes no mostraron indicios de inducción, al presentar una inhibición que en la fecha evaluada (14 días) se consideró como un retraso en la inducción de los tratamientos irradiados como se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Número de explantes y valores porcentuales en la inducción de callo embriogénico a los 14, 21 y 28 días posteriores a la siembra.**

Dosis (Gy)	14 días		21 días		28 días		Total	
	No. Explantes	%	No. Explantes	%	No. Explantes	%	Total	%
0	11	61.1%	3	16.6%	2	11.1%	<b>16 a</b>	<b>88.9</b>
10	5	27.7%	3	16.6%	3	16.7%	<b>11 b</b>	<b>61.1</b>
20	4	22.2%	2	11.1%	2	11.1%	<b>8 b</b>	<b>44.4</b>
30	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	<b>0 c</b>	<b>0.0</b>
Totales	20	37.0%	8	14.8%	7	12.9%	<b>35</b>	64.8

Valores con la misma letra dentro de columna no son estadísticamente diferentes

En la tercera semana (21 días) tres explantes más presentaron la inducción de callo embriogénico para el testigo y la dosis de 10 Gy, y solamente dos explantes en la dosis de 20 Gy, lo que significa que más del 50 % de los explantes que presentaron callo fue en las dos primeras semanas posterior a la siembra de los explantes (Cuadro 1).

En la cuarta semana (28 días) la inducción de callo se presentó en 16 explantes en el testigo que corresponden al 89% de los explantes sembrados; el 61% en 10 Gy el 44% en la dosis de 20 Gy, mientras que en la dosis de 30 Gy, los explantes se necrosaron sin que hayan presentado inducción de callo.

La inducción y la emergencia del callo embriogénico, coincide con lo reportado por González *et al.* (2005), quienes indujeron callo embriogénico en limbos foliares de Boniato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) a partir de células del parénquima perivascular del cual surgieron las estructuras embriogénicas, con el rompimiento de la epidermis, lo que permitió la emergencia de las células bipolares. Además esto explica la disminución del porcentaje de inducción en los explantes, lo cual es atribuible a radiación absorbida por el tejido.

Los resultados estadísticos mostraron diferencia significativa ( $P < 0.01$ ) entre tratamientos, presentando una disminución en la inducción de callo embriogénico en los explantes que fueron irradiados con 10 y 20 Gy, lo que indica que se presentaron cambios en la estructura genética de las células ocasionada por la radiación absorbida, disminuyendo la capacidad de inducción de células competentes hasta inhibirla como sucedió en la dosis de 30 Gy. Resultados similares fueron reportados por Kleiffer *et al.* (1985), al irradiar con rayos X embriones somáticos de *Euphorbia pulcherrina* con dosis de 10 a 60 Gy, donde la tasa de supervivencia disminuyó conforme la dosis se incrementó, reduciendo a 50% a los 30 Gy ( $DL_{50}$ ) y a 11% a los 60 Gy.

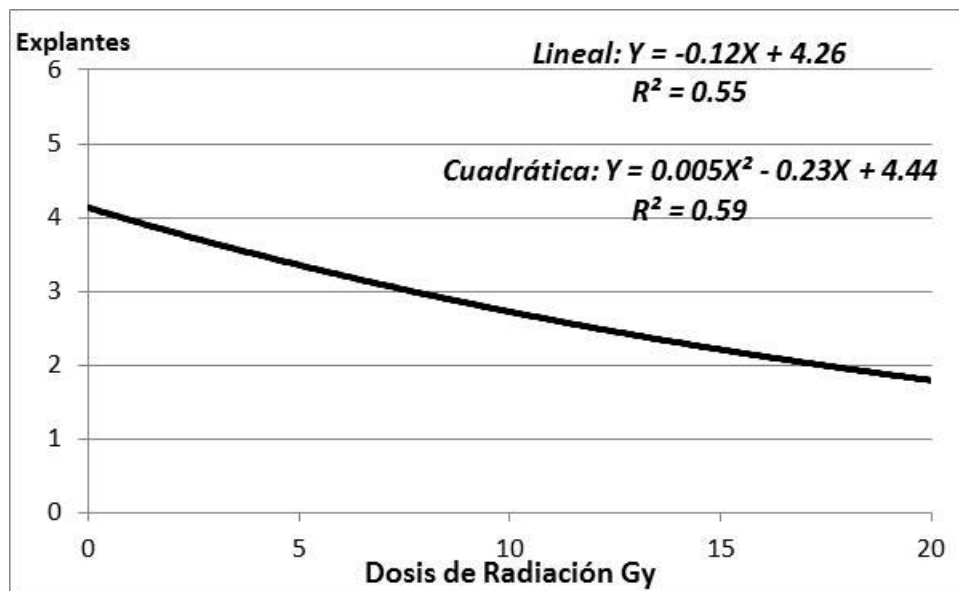
Además, es importante considerar que a pesar que la inducción se vio disminuida por la radiación absorbida por el tejido, se pueden obtener embriones somáticos a partir de germoplasma irradiado con dosis iguales o menores a 20 Gy, además que el efecto que tuvo, coincide con la dosis reductiva media ( $GR_{50}$ ), incrementando la probabilidad de obtener mutaciones benéficas (Morera, 2005).

Al analizar los resultados de la inducción, se encontró que la mayor inducción se presentó en el testigo a los 14 días posteriores a la siembra con 11 de los 18 explantes, mientras que en los tratamientos irradiados la inducción se reprimió drásticamente, presentando solo en cinco explantes

en la dosis de 10 Gy y cuatro en 20 Gy, lo que corrobora la diferencia estadística de acuerdo a las comparaciones ortogonales entre el testigo y las dosis de radiación, además que entre los tratamientos irradiados no hubo diferencia estadística, ya que solamente difirieron en un explante.

Además que el medio de cultivo y las condiciones de incubación fueron las mismas para todos los tratamientos, la mayor inducción se presentó en el testigo, por lo que las diferencias en relación a las dosis de radiación, están directamente relacionadas con las mutaciones que se presentaron en el contenido genético, alterando el programa de expresión de genes embriogénicos de las células somáticas, ya sean estas preembriogénicas o no embriogénicas, dado que el callo embriogénico está conformado por células bipolares en que cada una desarrolla un embrión somático(Street, 1977).

Al analizar el comportamiento de las dosis de radiación (X) y los explantes que indujeron callo (Y), se obtuvieron los componentes de regresión, presentando diferencia altamente significativa en el comportamiento lineal, y significativa en el componente cuadrático como se presenta en la Figura 1. La correlación es un indicador del grado de asociación entre la dosis de radiación absorbida y la inducción de callo, lo que se confirma con el comportamiento lineal, mientras que el cuadrático confirma que las mutaciones son eventos aleatorios y que los cambios que se producen en el material genético están directamente relacionados con la radiación absorbida por cada célula y difiere de una a otra.



**Figura 1. Correlación y regresión lineal entre las dosis de radiación (Gy) y el número de explantes que presentaron inducción de callo embriogénico.**

## **Desarrollo de callo embriogénico**

El Cuadro 2 presenta el comportamiento que tuvo el desarrollo de callo en cada una de las fechas evaluadas, obteniendo el crecimiento de los callos en cada fecha, ya que a diferencia de la inducción, donde la mayoría se presentó a los 14 días posteriores a la siembra, el crecimiento de los callos continuó durante el periodo de incubación.

En el Cuadro 2 se presentan los resultados estadísticos sobre el comportamiento que tuvieron los tratamientos en el desarrollo de callo a los 28 días posteriores a la siembra de los explantes. El análisis de varianza mostró diferencia significativa al 1% entre tratamientos, así como entre el testigo y las dosis de radiación. Además también hubo diferencia estadística entre las dosis de 10 y 20 Gy.

Los resultados indican que la radiación absorbida indujo cambios en el tamaño de callo, limitando el desarrollo conforme se incrementó la dosis de 10 a 20 Gy. Además, con base en el tamaño que alcanzó el testigo a los 28 días (1.28 cm), se tomó como el 100% de desarrollo, por lo que el crecimiento en la dosis de 10 Gy fue de 51% con respecto al testigo, mientras que en la dosis de 20 Gy, el desarrollo promedio de callo alcanzó el 36% lo que explica la diferencia estadística.

Por otra parte, al comparar el crecimiento de callo en cada fecha (Cuadro 2), a los 14 días el crecimiento del testigo presentó el 35% del desarrollo de callo, en comparación al 16.9 y 10.4% de los tratamientos con 10 y 20 Gy respectivamente. La diferencia en tamaño es una respuesta de los explantes a las mutaciones que se produjeron por la radiación absorbida, la cual no solo afectó la inducción de los callos, sino también tuvo efectos negativos en el desarrollo, ya que el diámetro promedio de callo en el testigo (0.45 cm) fue 51% superior a la dosis de 10 Gy (0.22 cm); y 71% a la dosis de 20 Gy (0.13 cm).

El tamaño promedio que alcanzó el testigo a los 28 días fue de 1.28 cm, que se tomó como el 100% para calcular el desarrollo de callo en los tratamientos irradiados, obteniendo que la dosis de 10 Gy fue 50% inferior en el tamaño de callo y la dosis de 20 Gy tuvo un crecimiento del 36% con respecto al testigo, lo que explica la diferencia significativa



**Cuadro 2. Desarrollo promedio de callo embriogénico en cuatro dosis de radiación.**

Dosis (Gy)	14 días		21 días		28 días	
	Diámetro (cm)	%	Diámetro (cm)	%	Diámetro (cm)	%
0	0.45	35.1	0.73	57.1	1.28 a*	100.0
10	0.22	16.9	0.38	13.0	0.65 b	50.6
20	0.13	10.4	0.27	10.4	0.47 c	36.4
30	0.00	0.0	0.00	0.0	0.00 d	0.0

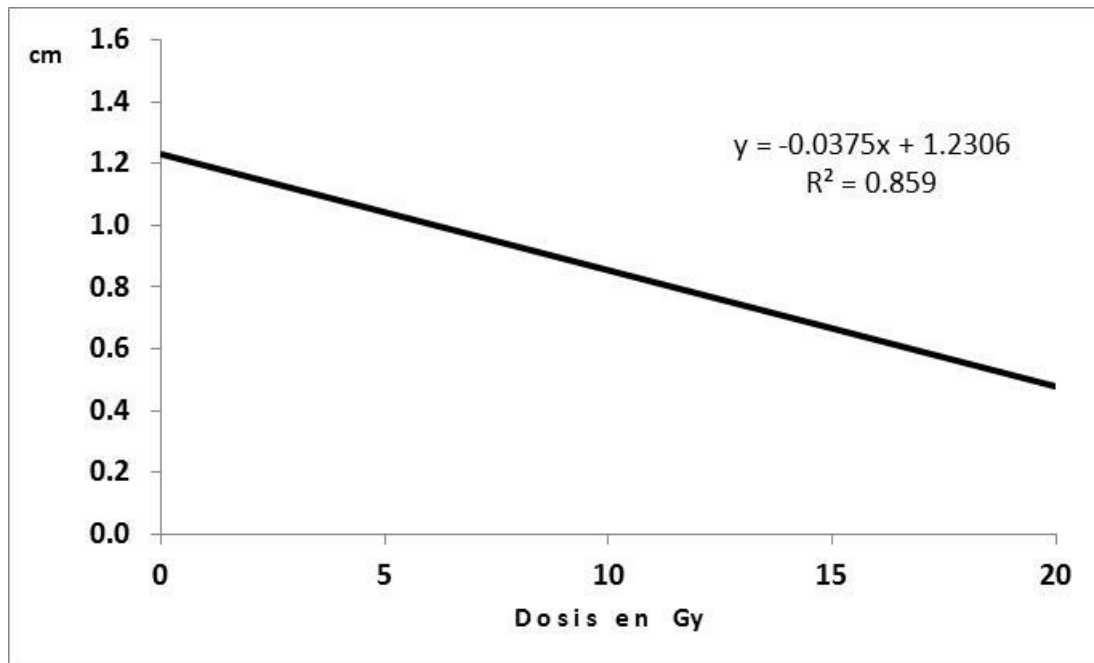
\*Valores con la misma letra dentro de columna no son estadísticamente diferentes (P > 0.05)

Al analizar el efecto que tuvo la radiación sobre el desarrollo de los callos, se obtuvo una disminución en el tamaño conforme la dosis se incrementó, lo que afectó la inducción de células competentes que no presentan conexión con el tejido vascular, por consiguiente el callo está conformado por células preembriogénicas que tuvieron la capacidad de inducir estructuras bipolares. Como se ha discutido, la radiación absorbida por el tejido somático, generó mutaciones que alteraron el contenido genético y que limitaron la inducción, la expresión y el desarrollo de las células competentes.

Se obtuvo una correlación negativa y significativa, lo que indica que el desarrollo del callo se ve afectado por la dosis de radiación, reduciendo su crecimiento conforme la dosis se incrementa como se presenta en la Figura 2. Además el coeficiente de determinación indica que el 86% de la inhibición en el desarrollo de los callos, se debió a las mutaciones que se originaron por la radiación absorbida, alterando el desarrollo de las células bipolares que se diferenciaron para la formación del callo embriogénico.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en la inducción de callo, se encontró una alta similitud en el comportamiento, debido a que la inhibición se presenta tanto en la inducción como en el desarrollo de los callos. Además al tomar en cuenta que en las dos variables la correlación es negativa y significativa, confirma por una parte que las mutaciones que se originaron en el tejido somático, propiciaron cambios que alteraron el ADN de las células competentes inhibiendo la inducción de callo embriogénico en unas células, mientras que en las que se presentó la inducción, se redujo el desarrollo, ya que en las dos variables se presentó la misma tendencia en los

tratamientos irradiados con respecto al testigo. Por otra parte, las dosis de radiación aplicadas aunque redujeron significativamente el desarrollo de los callos, este presentó el mismo comportamiento en relación al testigo, ya que los porcentajes de incremento de una fecha a otra, presentaron la misma tendencia en los tres tratamientos evaluados.



**Figura 2. Correlación y regresión lineal entre las dosis de radiación (Gy) y desarrollo de callo embriogénico.**

### **Desarrollo de embriones somáticos**

En el Cuadro 3 se presentan los resultados estadísticos referentes al desarrollo de embriones somáticos obtenidos, así como su longitud. El número de embriones presentó una diferencia significativa ( $p < 1\%$ ). Las diferencias entre tratamientos se determinaron mediante pruebas ortogonales siendo estadísticamente superior el número de embriones obtenidos en el testigo con respecto a las dosis de radiación, así como la diferencia entre las dosis de 10 y 20 Gy. Como se observa en el Cuadro 3, de los embriones obtenidos, el 48% correspondieron al testigo, seguido de la dosis de 10 Gy con el 31.5% y el 20.4% en la dosis de 20 Gy.

Al tomar en cuenta que no todas las células tienen la capacidad de expresar la totipotencia para la obtención de embrioides y que esta depende entre otros factores del genotipo (explante)

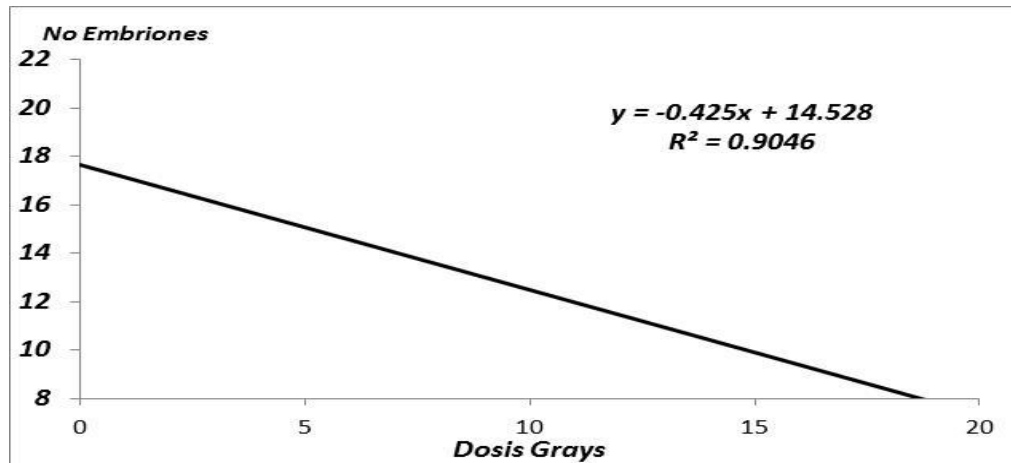
(Quiróz-Figueroa *et al.*, 2006), los resultados muestran que se ha inducido una amplia variación genética ya que el efecto de la radiación absorbida por el tejido, ha propiciado mutaciones que han alterado el comportamiento normal del ADN, al modificar la activación de los genes responsables de la capacidad embriogénica de las células competentes.

La longitud de los embriones somáticos presentó diferencia estadística al 1% entre tratamientos, presentando el testigo la mayor longitud con un desarrollo promedio de 9.62 mm, seguida de la dosis de 10 Gy con 8.11 mm y 6.92 en la dosis de 20 Gy. Este comportamiento muestra que el desarrollo de los embriones en las etapas globular, escutelo y coleoptilo se vieron alteradas por la radiación aplicada a los explantes, reduciendo el tamaño de estos, sin embargo todos los embriones alcanzaron la conversión a plántulas.

**Cuadro 3. Valores promedio de embriones somáticos y su longitud según los tratamientos de radiación.**

Dosis (Gy)	Embriones		Longitud	
	Número	%	(mm)	%
0	18	48.00	9.62	100.0
10	12	31.56	8.11	84.3
20	8	20.44	6.92	71.8

El efecto de la radiación sobre la maduración y el desarrollo de los embriones somáticos, tuvo un comportamiento negativo y estadísticamente significativo, ya que el número de embriones disminuyó conforme la dosis de radiación se incrementó ( $r = -0.95$ ), (Figura 3). Considerando que los cambios que se han presentado en los tratamientos irradiados en comparación al testigo, las mutaciones ocasionaron un comportamiento negativo en las variables evaluadas, por lo que los coeficientes de determinación indican la influencia que tuvo la radiación absorbida en los cambios que se originaron por las mutaciones, así como al disminución en el comportamiento de cada variable en comparación al tratamiento testigo.



**Figura 3. Correlación y regresión entre dosis de radiación (Gy) y número de embriones.**

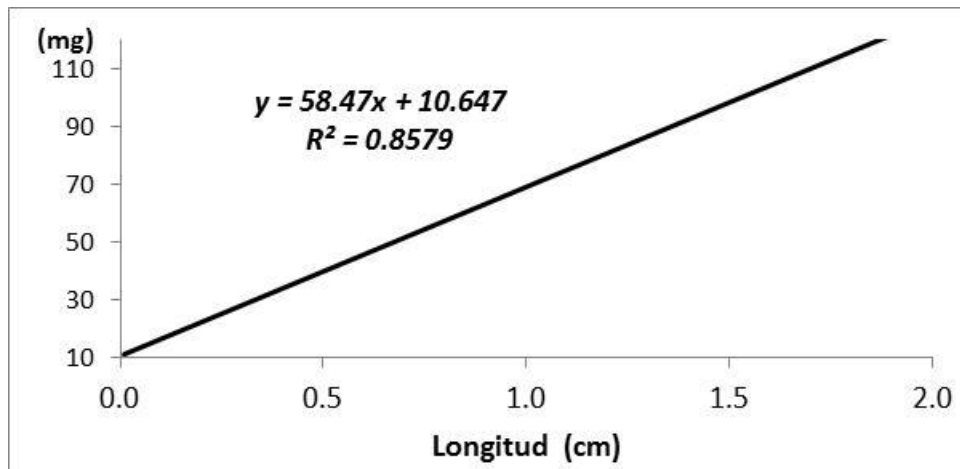
De igual manera, en la medición que se hizo para determinar la longitud de los embriones somáticos, hubo diferencia significativa entre tratamientos, disminuyendo la longitud conforme la dosis se incrementó. Al tomar como el testigo como el desarrollo normal de los embriones, se observa que la longitud en la dosis de 10 Gy fue 16% menor que el testigo y 29% en la dosis de 20 Gy, lo que por una parte explica la diferencia estadística entre tratamientos, y por otra que a pesar que el crecimiento disminuyó con la radiación, en ambos tratamientos se presentó la conversión a plántula, lo que indica que a pesar de los cambios que se presentaron en los tratamientos por el efecto de la radiación, es viable la obtención de embriones somáticos a parir de germoplasma irradiado con bajas dosis.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Portillo *et al.* (2007), quienes trabajaron con diferentes genotipos y combinaciones de auxinas y citocininas, obteniendo callos embriogénicos friables de color crema con células y células globulares pequeñas y elongadas. Los callos maduraron y germinaron dando embriones somáticos que produjeron plántulas de morfología normal, demostrando que se completó el proceso de embriogénesis somática indirecta en *A. tequilana*.

### **Asociación entre longitud y peso de callo**

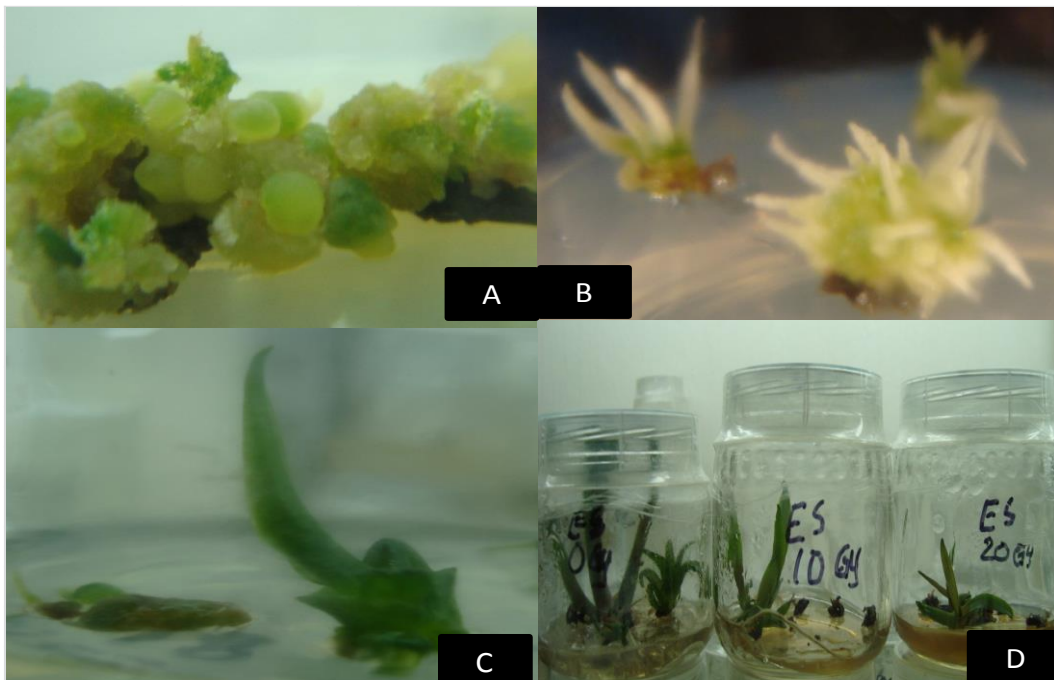
Se obtuvo una correlación positiva y significativa ( $r = 0.93$ ) al 1% de probabilidad entre la longitud del callo y su peso a los 28 días de incubación, por lo que el grado de asociación que hay entre estas variables, permite conocer el peso a través de la longitud o viceversa, ya que el comportamiento lineal que explica el grado de asociación está dado por la ecuación:  $Y = 58.47X +$

10.64. Por lo tanto en un análisis estadístico, se puede utilizar cualquiera de las dos variables, peso o longitud con la misma exactitud y confiabilidad.



**Figura 4. Correlación y regresión entre el tamaño y el peso de callo.**

El coeficiente de determinación indicó que el 85% del peso del callo, depende del tamaño que este alcance; por lo que la relación que se presenta entre estas dos variables es directamente proporcional, debido a que ambas dependen del tiempo que se mantengan en cultivo, hasta que el callo alcance su madurez y sea transferido a un medio para la maduración de los embriones



**Figura 5. Proceso de embriogénesis somática indirecta. A. Callo embriogénico. B. Embriones somáticos. C y D. Maduración y conversión en plántulas: 0 Gy (testigo), 10 Gy y 20 Gy.**

## CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron durante el desarrollo de la investigación en cada una de las etapas del proceso de embriogénesis somática indirecta, se logró establecer el protocolo en vitroplántulas irradiadas. Se determinaron los efectos de la radiación sobre el tejido somático, así como la viabilidad en la conversión en plántulas a partir de la obtención de embriones somáticos.

La radiación ocasionó mutaciones que alteraron el comportamiento de las células competentes, reduciendo significativamente la inducción de callo embriogénico, su desarrollo y la obtención de embriones somáticos en comparación al testigo, lo que permite obtener plántulas con un genotipo único a partir de una célula irradiada con dosis menores o iguales a 20 Gy, ya que los efectos de la radiación no se hicieron presentes en la conversión de embriones a plántulas completas.

## BIBLIOGRAFIA

- Arizaga, S. 2008. En peligro el tequila mexicano. Lo que somos. Rvista electronica <http://www.loquesomos.org/amasando/elbicho/tequila.htm>.
- Evans, D., W. Sharp and C. Flick. (1981) Growth and behavior of cell cultures, embryogenesis and organogenesis. En: Plant Tissue Cultura, methods and applications in agriculture. Thorpe, T (Ed) pp. 45-113. Academic Press. New York
- González, H., J. Del Real y J. Solís (2007b) Manejo de Plagas del Agave Tequilero. Ed. Colegio de Postgraduados y Tequila Sauza, S.A de C.V. 123 p.
- González, O.S., O. Sam, M. Hernández, M. Coronado y J. Silva. 2005. Caracterización Histológica de la Embriogénesis Somática a Partir de Limbos Foliare de Boniato (*Ipomoea batatas* L. Lam.). Cultivos Tropicales, vol. 26, no. 4, p. 37-41
- Hurtado de la P. S. 2008. Variabilidad Intraespecífica en in *Agave tequilana* Weber var azul Detectada con Caracteres Morfológicos y Moleculares. Tesis Doctoral sin publicar. CUCBA, Universidad de Guadalajara, Jalisco. México .
- Kleffel, B., F. Walter and W. Preil.. 1985. X-ray-Induce Mutability in Embryogenic Suspension Cultures of *Euphorbia pucherrima*: proceedings of a Symposim, Vienna, 19 – 23 August. pp: 113 - 120

- Martín, A., A. Fernández y R. Mejía. 2011. Capacidad Embriogénica de Callos Inducidos en Ejes Embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 34 (2): 101 – 106.
- Martínez, P., M. Ortega, V. Chávez y R. Bye (2003) Somatic embryogenesis and organogenesis of *A. victoria-reginae*: Considerations for its conservation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 74:135-142.
- Medina, C., I García, M. Caro y F. Aristizába. 2007. Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. Vol. 36 (1), 70-80.
- Morela, F, V. González y L. Castro (2002) Efecto de la radiación Gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos. Agron. Trop. 52:311-323.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Portillo, L., F. Santacruz, A. Gutiérrez y B. Rodríguez. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *in vitro* Cell.Dev.Biol.—Plant (2007) 43:569–575
- Reyes, C. P. 1978. Diseño de Experimentos Agrícolas. Primera Edición. Ed. Trillas 344.P
- Rodríguez, G. B. 2004. La materia prima *Agave tequilana* Weber var azul. Avances de la Investigación en el Agave Tequilero. Consejo Regulador del Tequila. P: 3-43
- Rodríguez, O., B. Pentiado y C. Valle. (2000). Embryo rescue of interespecific hybrids of *Brachiaria spp.* Plant Cell Tissue and Organ Culture. 61: 175-182
- Rodríguez, G.B., A. Gutiérrez and B. Acosta (1996) Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46:85-87.
- Santacruz, R. F., H. Gutiérrez and B. Rodríguez (1999) Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 56:163-167.
- Soltero, R, M F Nieto, C Ramírez (1999) Embriogénesis somática en *Agave tequilana* Weber, hacia el mejoramiento genético. *In*: VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 12 al 17 de septiembre, Huatulco, Oaxaca. México. pp: 548.
- Street, H. 1977 Plant Tissue and Cell Culture. University of California Press. Second Edition. 614 p.

## **CAPÍTULO IV**

### **EVALUACIÓN NO DESTRUCTIVA DE LA PATOGENICIDAD DE *Cercospora agavicola* EN VITROPLÁNTULAS DE *Agave tequilana* var. Azul IRRADIADAS CON RAYOS GAMMA Co<sup>60</sup>**



**EVALUACIÓN NO DESTRUCTIVA DE LA PATOGENICIDAD DE *Cercospora agavicola*  
EN VITROPLÁNTULAS DE *Agave tequilana* var. Azul IRRADIADAS CON RAYOS  
GAMMA Co<sup>60</sup>**

**NONDESTRUCTIVE EVALUATION OF PATHOGENICITY OF *Cercospora agavicola* ON  
*Agave tequilana* var. Azul PLANTLETS IRRADIATED WITH GAMMA RAYS Co<sup>60</sup>**

**A. Angeles-Espino<sup>1</sup>, A. J. Valencia-Botín<sup>2\*</sup>, G. Virgen-Calleros<sup>1</sup>,  
C. Ramírez-Serrano<sup>1</sup>, L. Paredes-Gutiérrez<sup>3</sup> and S. Hurtado-De la Peña<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup> *Centro Universitario de la Ciénega. Universidad de Guadalajara. Av. Universidad 1115, Ocotlán, Jalisco, México. CP 47820.*

<sup>3</sup> *Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares. Ocoyoacac, Estado de México.*

*E-mail: [alberto.valencia@cuci.udg.mx](mailto:alberto.valencia@cuci.udg.mx)*

*\* Corresponding author*

## **RESUMEN**

El cultivo del agave y el tequila tienen importancia económica y social por los empleos en campo y la industria, además las divisas de la exportación. El tizón foliar causado por *Cercospora agavicola* representa un alto riesgo en la zona de Los Altos de Jalisco, debido a que el clima favorece la dispersión y germinación de las esporas. Se inocularon plántulas obtenidas a partir de yemas axilares mismas que se irradiaron con rayos gamma Co<sup>60</sup> a 0 (testigo), 5, 10, 15, 20, 25 y 30 Gy conformándose un experimento con siete tratamientos y cinco repeticiones. Muestras de síntomas de plantas con tizón se colectaron en campo. Se aisló el hongo, purificó y multiplicó en medio PDA a 25°C. Para la inoculación, las hojas se colocaron en cajas de Petri con papel secante humedecido. La inoculación se efectuó a una concentración de 20,000 esporas/mL<sup>-1</sup>. Se evaluó el tamaño de la lesión (mm<sup>2</sup>) a los 21 días. El tamaño de la lesión disminuyó conforme la dosis de radiación se incrementó, se clasificaron en tres grupos de acuerdo al grado de la lesión: 0 y 5 Gy

mayor al 90%, 10 y 15 Gy de 60 a 80% y 20, 25 y 30 Gy menor al 20%. Las pruebas de patogenicidad deben corroborarse en plantas de 6 meses con hojas engrosadas y endurecidas.

**Palabras clave:** Agave, *Cercospora agavicola*, mutantes, patogenicidad.

### ABSTRACT

The agave crop and tequila industry have cultural, economic and social impact since the employment offered under the Agro and industrial fields. Besides, the currencies obtained by exportation. The fungal agave disease by *C. agavicola* represents high risk at the Altos zone in Jalisco, since the environment allows spores germination. Inoculation was done on plantlets obtained from axillary buds culture and were irradiated by gamma rays  $Co^{60}$ : 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 Gy, and 5 replicates each. Plant samples blight were collected in the field. Which were proliferated and purified onto PDA medium at 25°C. The fungus was inoculated directly into Agave leaves in a solution of 20,000 spores /mL<sup>-1</sup>; all material was transferred onto sterile Petri dishes. The evaluation was done taking data of the percentage of infected leaf per treatment. Spot size decrease when dose irradiation increase. Three kinds of percent damage were found, 0 and 5 Gy up 90%, 10 and 15 Gy between 60 and 80% and 20, 25 and 30 Gy less 20%. Pathogenicity tests must be corroborated on 6 months plants with hardened and thick leaves.

**Key words:** Agave, *Cercospora agavicola*, mutants, pathogenic.

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de *A. tequilana* así como el tequila tienen alta importancia económica y social. El tequila ha sido la bebida más popular y tradicional de México. Sin embargo en cuanto a investigación de las especies se le ha dado poca importancia en comparación a otros cultivos (González, 2007).

Se considera que la enfermedad tizón foliar causada por el hongo *Cercospora agavicola* misma que se presenta de octubre a marzo, tiene requerimientos de alta humedad relativa y se caracteriza por provocar manchas ovaladas y secas de color gris en las hojas cercanas al cogollo, manifestando una clorosis generalizada y avanza hacia el centro del mismo hasta alcanzar la piña dificultando la recuperación de la planta. Al inicio las plantas afectadas aparecen en forma aislada,

pero conforme avanza el contagio a otras plantas se forman manchones grandes. La enfermedad es muy agresiva dado que el síntoma es irreversible y si no se controla puede provocar la muerte de la planta en un mes dependiendo de las condiciones ambientales.

Ayala (2005), menciona que en enero de 2003 en el municipio de Pénjamo, Guanajuato se observó una nueva enfermedad en *A. tequilana*. El material se llevó a Alemania para confirmar su identificación. Se completaron los postulados de Koch satisfactoriamente confirmando a *C. agavicola* como el organismo causante de la mancha y necrosis de la hoja del agave. *C. agavicola*, se comparó con otras especies causantes de cercosporosis basada en la secuencia de la región de los genes ITS-rDNA y genes de la elongación del factor 1-a, actina, calmodulina e histona H3.

Groenewald (2005), menciona que el género *Cercospora* es uno de los más diversos. *C. appi sensu lato* es el nombre más antiguo del complejo morfológicamente indistinguible de especies de *Cercospora* que presenta en un amplio rango de hospederos. Se reportan más de 3,000 especies de *Cercospora*, de las cuales actualmente se reconocen 659 y otros 281 nombres de otras especies morfológicamente idénticas. Generalmente las especies de *Cercospora* son específicas a los hospedantes, al nivel de familia, género o planta, por lo que este concepto ha llevado a la descripción de un amplio número de especies.

Chen (1979), reporta que *Cercospora* se ubica entre los patógenos de plantas más frecuentes y destructivos. Afecta un amplio rango de hospedantes, siendo uno de los factores de patogenicidad la producción de una exotoxina de color rojo denominada cercosporina.

Morfológicamente, los conidios de *Cercospora* son alargados de forma filamentosa y hialinas, se desarrollan sobre conidióforos agrupados que nacen de un punto común sobre el tejido vegetal, estos conidios son transportados por el viento hasta la presencia de una película de agua sobre el follaje y los tubos germinativos penetran en la hoja a través de los estomas, una vez que el patógeno ingresa al tejido vegetal, produce toxinas las cuales ocasionan la muerte de las células vegetales dando origen a las lesiones necróticas.

Vanegas y De León (2002), trabajando con líneas endogámicas de maíz, encontró que la resistencia a *Cercospora zea maydis*, se controla por efectos maternos o citoplásmicos. La acumulación de genes de resistencia y la conformación de variedades sintéticas resistentes es una

alternativa a implementar en programas del mejoramiento de resistencia al tizón de maíces tropicales.

Con base en lo anterior se planteó el objetivo de evaluar la patogenicidad de *Cercospora agavicola* en hojas de vitroplántulas de *A. tequilana* Weber variedad azul irradiadas con Rayos Gamma Co<sup>60</sup> así como seleccionar genotipos resistentes.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material biológico**

Estuvo conformado por el hongo *Cercospora agavicola* y las plántulas de agave obtenidas *in vitro* a partir de yemas axilares, que fueron irradiadas con rayos gamma Co<sup>60</sup>.

### **Colecta en campo de hojas enfermas**

El material vegetal enfermo se colectó en plantaciones comerciales de agave de tres años de edad ubicadas en el Municipio de Arandas perteneciente a la zona de los Altos de Jalisco ubicado a 20°41'58" Latitud Norte, 102°21'57" Longitud Oeste y una altitud de 2,049 msnm.

El muestreo se llevó a cabo en tres predios y se seleccionó un surco de forma aleatoria al ingresar a la plantación como punto de referencia, a partir del cual se seleccionaron otros nueve cada 5 o 10 surcos, dependiendo de las dimensiones de la plantación. Se hicieron recorridos observando las plantas del surco seleccionado y del surco adyacente, en los que se localizaron plantas con los síntomas del hongo. Se separó la hoja de la planta, se cortó la sección donde se presentaba la presencia del hongo, se envolvió en papel periódico humedecido y se colocaron en bolsas de plástico, mismas que se identificaron con el predio, la fecha de la colecta y el número secuencial de acuerdo a las hojas que se obtuvieron.

### **Aislamiento del agente causal**

### **Preparación medio de cultivo**

El medio en el que se llevó a cabo el aislamiento, purificación y multiplicación del hongo *C. agavicola* fue Papa Dextrosa Agar y Agave (PDAA).

El medio de cultivo se preparó moliendo 100 g de hojas de agave de la parte central de la planta (hojas jóvenes) en un litro de agua. Se pesaron 250 g de papa, se cortaron en trozos y se pusieron en un matraz Erlenmeyer que contenía un litro de agua destilada. Se dejó hervir durante 20 min y se filtró con algodón. Se midieron 500 ml tanto del filtrado procedente del molido de las hojas de agave, como del concentrado de la cocción de la papa.

Posteriormente, se adicionaron 20 g de agar bacteriológico y 10 g de dextrosa anhidra. Se ajustó el pH a 6.0 con NaOH y HCl 1N. Se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión y 121 °C durante 15 min. El medio estéril se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 40 °C y se adicionaron 2 g/L de AGRYGENT (Gentamicina).

Se vaciaron de 15 a 20 mL de agar en cajas de Petri estériles y se dejaron solidificar. Las cajas de medio preparadas fueron guardadas en refrigeración para su uso posterior utilización.

Las hojas de agave con los síntomas del hongo se mantuvieron cubiertas con papel sanitario en bolsas de plástico previamente humedecidas para favorecer la germinación de las esporas.

Las hojas se seccionaron dejando únicamente las áreas que presentaban las lesiones del hongo, mismas que se colocaron en cajas de Petri y se colocaron en la cámara de flujo laminar en condiciones asépticas.

La inoculación se llevó a cabo al realizar una herida con aguja sobre la superficie de las hojas con los síntomas del hongo. Además, se colocaron esporas en tubos con 1 mL de agua destilada esterilizada, para distribuir uniformemente el agua con la concentración de esporas en toda la caja de Petri con el medio de cultivo PDAA. Las cajas de Petri se sellaron, rotularon y se pasaron a la cámara de incubación a una temperatura de 25 °C en obscuridad.

### **Purificación del hongo**

Los materiales inoculados se revisaron cada cinco días para dar seguimiento al desarrollo del hongo. Se seleccionaron las muestras que presentaron los síntomas que induce *C. agavicola*. Se tomó una muestra y se colocó en un portaobjetos y se observaron al microscopio. Los aislamientos que presentaron las características morfológicas de *Cercospora*, se reaislaron y se sembraron nuevamente en medio fresco PDAA para su multiplicación.

Periódicamente se llevaron a cabo las revisiones de las inoculaciones, de las que se tomaron muestras para la observación en microscopio y el reconocimiento de las esporas, así como la presencia de la toxina “cercosporina”. El proceso se continuó hasta que se desarrollaran todos los síntomas sin que estuvieran contaminadas, ya fuera por otros hongos o por bacterias.

Además de la identificación de estructuras morfológicas del hongo, se corroboró la presencia de toxina de *Cercospora* por la presencia de un pigmento rojo, característico del hongo y que corresponde a producción de la toxina “cercosporina”. Una vez que se alcanzó la purificación del hongo, se cambió de medio para su multiplicación cada 21 días, corroborando la morfología de los conidios, así como la presencia de la toxina “cercosporina”.

## **Pruebas de patogenicidad**

### **Obtención de las hojas**

Las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo en hojas de plántulas de agave azul tequilero obtenidas *in vitro* a través de yemas axilares (Capítulo 1) mediante el método de hoja desprendida (Pettitte *et al.*, 2011). Previo a las inoculaciones, las plántulas se irradiaron con Rayos Gamma Co<sup>60</sup> con las siguientes dosis: 0 (testigo), 5, 10, 15, 20, 25 y 30 Gy.

En cajas de Petri se colocó papel secante, se envolvieron en papel aluminio y se esterilizaron en autoclave a una presión de 1.4 Kg/cm<sup>2</sup> (20 lb) y una temperatura de 121 °C por 15 minutos.

En la cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia se llevaron los contenedores con las plántulas *in vitro* y se identificaron de acuerdo a la dosis de radiación recibida. Se extrajeron las plántulas y se colocaron en cajas de Petri previamente esterilizadas. Con bisturí se cortaron las hojas y las plántulas se devolvieron al medio de cultivo y se sellaron.

### **Obtención del inóculo**

Se preparó una suspensión de agua bidestilada esterilizada conteniendo las esporas del hongo. En la cámara de flujo laminar con una aguja de disección se obtuvieron las esporas del hongo y se colocaron en tubos con 1 mL de agua bidestilada. Se tomó una gota agua y se colocó en la cámara Newbauer para determinar la concentración de esporas en la suspensión.

## Conteo de esporas

Se colocó la muestra bajo el cubreobjetos con la suspensión de esporas alcanzando una altura de 0.1 mm. Se contaron las esporas que estuvieron dentro de los cuadros grandes (o sea, en 25 cuadrados medianos), por lo que la concentración en cada muestra se calculó con la siguiente fórmula:

$$N \times 10^4 \text{ esporas } ml^{-1}$$

Tomando en cuenta que las esporas se colocaron en una dilución de 1 mL, las esporas en la concentración quedó:

$$N \times 10^4 \times 1ml = \text{esporas } ml^{-1}$$

La inoculación en el tejido se llevó a cabo con una concentración de 20,000/mL<sup>-1</sup>, por lo que el volumen a aplicar se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Volumen} = \text{concentración de esporas a inocular} / \text{número de esporas contadas}$$

## Diseño experimental

Se diseñó un experimento simple con una distribución completamente al azar con tres repeticiones. Los datos se procesaron por análisis de varianza y las medias se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey al 5% de probabilidad. Además, se hizo un análisis de correlación y regresión para determinar la relación entre dosis y plantas. La unidad experimental constó de una caja de Petri con tres hojas. Las mediciones se hicieron a los 15 días posteriores a la inoculación.

## Inoculación

La inoculación se llevó a cabo en cajas de Petri, a las que se les colocó papel secante se envolvieron en papel aluminio y se esterizaron en autoclave a una presión de 1.4 kg/cm<sup>2</sup> a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos, además se esterilizó agua destilada para la dilución de las esporas.

La inoculación se llevó a cabo en cinco plántulas por dosis de radiación usando la técnica de hoja desprendida, colocando tres folíolos por cada tratamiento. En la cámara de flujo laminar bajo

condiciones de asepsia, se llevaron los contenedores con las plántulas que se encontraban en ambiente estéril. Se extrajeron las plántulas y se colocaron en cajas de Petri previamente esterilizadas, donde se retiraron las hojas, mismas que se fueron colocando en nuevas cajas de Petri con el papel secante y esterilizadas. Una vez que se retiraron las hojas, las plántulas se regresaron a sus contenedores y se mantuvieron bajo condiciones de esterilidad.

Se hizo el conteo de las esporas en la cámara Bauer y se hicieron las diluciones a una concentración de  $20,000$  esporas/ $\text{mL}^{-1}$ . Con una jeringa estéril se añadieron  $10$  mL de agua previamente esterilizada en cada caja de Petri humedeciéndolo a saturación, pero sin que sobrepasara el grosor del papel secante. A cada hoja se le hicieron tres heridas de manera longitudinal al tamaño de esta y se añadieron  $0.5$  mL en cada hoja procurando que este quedara uniformemente distribuido a lo largo de las lesiones que se hicieron. Se sellaron y rotularon y se colocaron en un estante verificando que no se hubiera derramado el agua con las esporas inoculadas.

El testigo estuvo conformado por dos tratamientos en los que las vitroplántulas no fueron irradiadas. A las hojas del primero se le hicieron las heridas y se inoculó con agua bidestilada estéril, y en las hojas del segundo se le hicieron las heridas y fueron inoculadas con las esporas del hongo.

A los cinco días posteriores a la inoculación, se revisaron las muestras inoculadas asegurándose que el agua con las esporas se encontrara en cada hoja, así como la humedad del papel secante. En las hojas que fue necesario se reinoculó manteniendo la concentración a  $20,000$  esporas/ $\text{mL}^{-1}$  sellando nuevamente las cajas. Las revisiones se hicieron cada 5 días reponiendo la humedad cuando así se requirió.

Las mediciones de las lesiones se llevaron a cabo 21 días posteriores a la inoculación. Se estableció un área de  $2\text{ cm}^2$  tomando  $2$  cm de manera longitudinal y un cm a lo ancho de las hojas. A partir de esta superficie se hicieron las mediciones de las lesiones.

Además se obtuvieron los valores porcentuales de acuerdo al área afectada en cada tratamiento con respecto al área de la hoja ( $2\text{ cm}^2$ ), así como a partir del tamaño promedio de la lesión del tratamiento sin irradiar (testigo), el que se consideró como el diámetro máximo de la lesión, y por consiguiente el 100%; a partir del cual se determinó el porcentaje de infección con respecto al testigo.

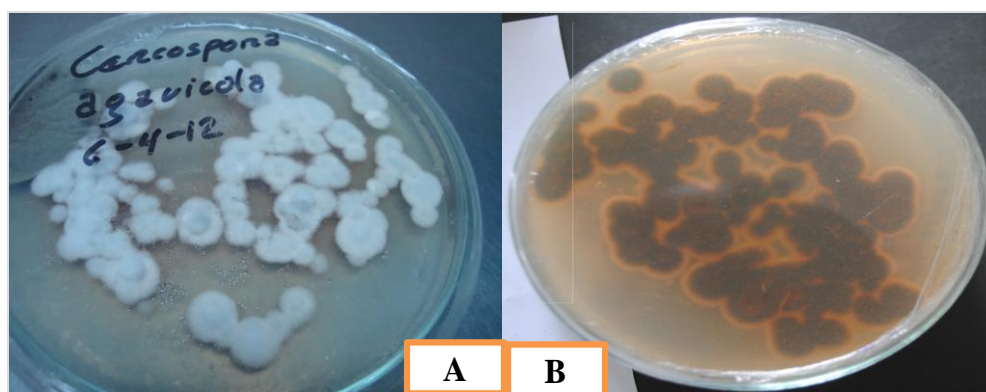


## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamiento y purificación de *Cercospora agavicola*

Se obtuvo el aislamiento y la purificación del hongo colectado en campo, el proceso llevó 18 meses hasta obtener la cepa de *C. agavicola*. En cada siembra que se realizó del hongo en medio fresco, se hicieron las observaciones en microscopio óptico para verificar que los conidios en el medio de cultivo correspondían a *C. agavicola*.

Una vez que se tuvieron los cultivos de *C. agavicola* sin la presencia de contaminantes, se observó la presencia de la toxina cercosporina que produce un color rojo oscuro intenso en el medio PDA, lo que confirmó que el hongo cultivado correspondió a *C. agavicola* (Figura 1).



**Figura 1. A. Cultivo purificado de *C. agavicola*, B. presencia de cercosporina.**

### Pruebas de patogenicidad

Los resultados que se obtuvieron de las pruebas de patogenicidad en las que se evaluaron las lesiones y el daño ocasionadas por *C. agavicola* sobre las hojas, tomando los valores promedio por tratamiento de radiación, se presentan en el Cuadro 1.

En promedio la lesión del tratamiento sin irradiar, ocupó el 33.9% de la superficie considerada en el foliolo ( $2 \text{ cm}^2$ ). Los síntomas se presentaron en todos los tratamientos evaluados, lo que coincide con lo reportado por Pettit *et al.* (2011), quienes reportan la presencia de necrosis al inocular hojas de crisantemo (*Dendrathera grandiflorum* Ramat) separadas de la planta con *Phytium* sp.

**Cuadro 1. Área foliar afectada y porcentaje de infección por *C. agavicola* en foliolos de vitroplántulas de *A. tequilana* Weber var. Azul. Irradiadas con Co<sup>60</sup>.**

Dosis	0 Gy	5 Gy	10 Gy	15 Gy	20 Gy	25 Gy	30 Gy	Promedio
Área infectada (cm <sup>2</sup> )	0.67 c <sup>1</sup>	0.63 c	0.51 b	0.43 b	0.13 a	0.07 a	0.10 a	0.36
Por ciento de infección en área foliar	33.93	31.73	25.80	21.90	6.53	3.97	5.30	18.45
Por ciento de infección frente al testigo	100.0	93.5	76.0	64.5	19.2	11.6	15.6	54.3

<sup>1</sup>Tratamientos con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey 0.05)

Como se muestra en el Cuadro 1, los resultados presentaron una amplia gama en la respuesta de los tratamientos a la presencia de *C. agavicola*, lo que sugiere que la radiación absorbida en el tejido, originó mutaciones que deben estar relacionadas directa o indirectamente con los mecanismos de defensa, que son inducidos como consecuencia del reconocimiento, actuando en conjunto para detener el avance del patógeno (Madriz, 2002), ya que el comportamiento de las plantas frente al ataque del hongo, presentó una respuesta diferenciada en cada dosis de radiación que recibieron las plántulas (Figura 2).

Resultados similares fueron obtenidos por Gosal *et al.* (1998) al irradiar yemas de papa cultivadas *in vitro* a 20 y 40 Gy con rayos Gamma Co<sup>60</sup>. Los microtubérculos se multiplicaron *in vitro* y se plantaron en macetas. Las plantas obtenidas se seleccionaron para tizón tardío, encontrando que las plantas irradiadas con 40 Gy mostraron resistencia, mientras que esta fue menor en los tratamientos con 20 Gy. La progenie resistente se plantó en campo y se inoculó con esporas del hongo. En campo aproximadamente el 56% de la progenie segregante mostró resistencia; mientras que para la siguiente propagación el patrón de resistencia se incrementó al 72% en las plantas multiplicadas *in vitro* M<sub>1</sub>V<sub>3</sub>.

Es importante mencionar que el planteamiento de las dosis de radiación se consideraron pretendiendo conocer la respuesta de las vitroplántulas frente al hongo *C. agavicola* y así establecer una tendencia que muestre la mayor respuesta en los tratamientos frente al grado de infección de

acuerdo al tamaño de la lesión que se origina en dada una de las dosis de radiación, así como el comportamiento de los tratamientos cercanos a la dosis letal media ( $DL_{50}$ ). Correa–Victoria 2001, menciona que la pérdida de resistencia a *Pyricularia grisea* Sacc. en arroz, se debe a que se busca una resistencia vertical con genes mayores generando resistencia en el patógeno. Con la idea de comprobar la resistencia poligénica, se obtuvieron 37 mutantes con rayos gamma de una línea comercial y fueron inoculadas con el hongo. Los resultados mostraron que se requiere la evaluación de poblaciones grandes de mutantes para incrementar la probabilidad de identificar una resistencia genética a los genotipos evaluados como una fuente de resistencia complementaria frente al patógeno.

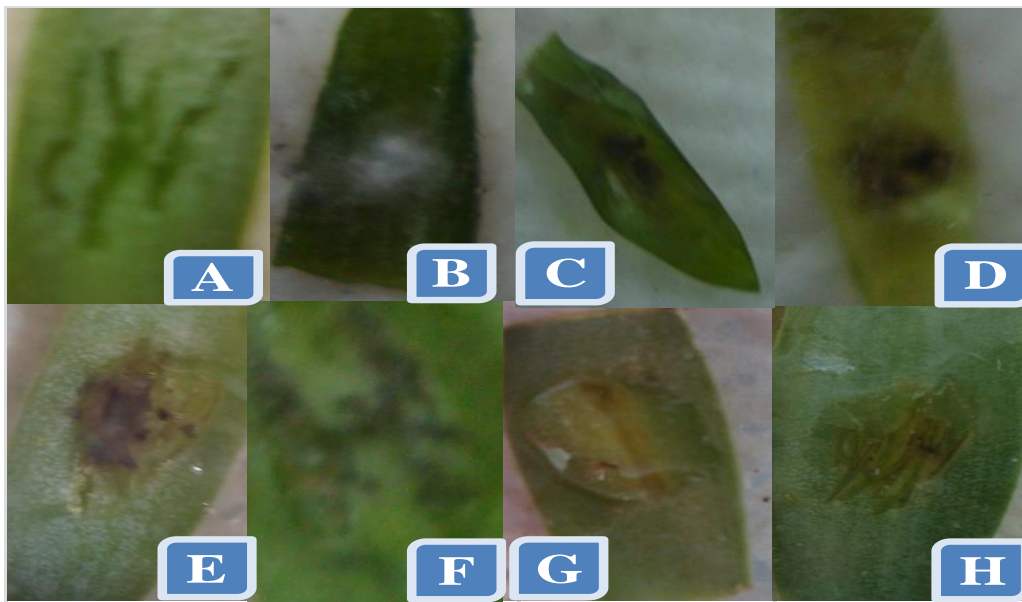
Por otra parte, los resultados de esta investigación son un indicio de que se indujeron mutaciones que modificaron diversos procesos dentro de los mecanismos de defensa químicos y bioquímicos que desarrollan las plantas frente a la presencia de un patógeno. Es importante notar que la inoculación se hizo en tejido joven (vitroplántulas) que no han desarrollado la suberización y lignificación que caracteriza a la familia de las agaváceas, además que se encuentran en un ambiente estéril y que no están adaptadas a las condiciones del medio ambiente.

Estadísticamente, se obtuvo una diferencia significativa ( $P < 1\%$ ) entre las dosis de radiación, lo que se explica por la variación que se presentó en el diámetro de la lesión de acuerdo a la dosis de radiación que recibió cada tratamiento, como se presenta en el cuadro 1. Por su parte, en la prueba de Tukey, se identificaron tres grupos en cuanto al diámetro de la lesión (porcentaje) en relación al área considerada, el primero con de la dosis de 5 Gy es estadísticamente igual al testigo con el 33 y 31% respectivamente; el segundo en el que las lesiones correspondientes a las dosis de 10 y 15 Gy con 25 y 21% y el tercero en el que se ubican las dosis de 20, 25 y 30 Gy donde las lesiones tuvieron un diámetro menor a 10%.

Este comportamiento indica que el diámetro de la lesión disminuyó conforme se incrementó la dosis de radiación, por lo que los resultados sugieren que puede estar presente un comportamiento genético aditivo, ya que la reducción no presentó valores contrastantes. Además, la diferencia en porcentaje entre el testigo y el tratamiento de 25 Gy fue de 30%, presentándose valores intermedios en las demás dosis.

La variación que se presentó en el tamaño de la lesión de acuerdo a la dosis de radiación, muestra que en el tejido irradiado se indujeron cambios que ocasionaron que las lesiones ocasionadas por *C. agavicola* fueran menores a mayor dosis de radiación absorbida (Figura 2), por lo que una posibilidad es que se hayan generado mutaciones en genes que están relacionados de una manera directa o indirecta con la síntesis de metabolitos secundarios que forman parte de los mecanismos de defensa de la planta frente a un patógeno, tales como fitoalexinas, terpenoides, alcaloides, amidas, flavonoides, fenoles, compuestos proteicos anti fúngicos o inhibitinas (Montes-Belmont, 2009).

La respuesta de la inoculación a las plántulas de agave, concuerda con lo obtenido por Valdez y Orellana (2004), que regeneraron plántulas de caña de azúcar (*Sacharum* sp.) de la variedad SP 70-1284 obtenidas *in vitro* a partir de callos irradiados con 30 Gy y se inocularon con la roya de la caña de azúcar *Puccinia melanocephala*. Se observó un 14.28% de los cambios fenotípicos totales en plántulas M<sub>1</sub>V<sub>1</sub> se seleccionaron tres posibles mutantes con menor afectación frente a la enfermedad, por lo que el carácter de resistencia y la eficiencia del cultivo de tejidos y la inducción de mutaciones con la dosis de 30 Gy fue de un mutante por cada 125 plantas evaluadas en fase temprana de selección.



**Figura 2. Inoculación de *C. agavicola* en vitroplántulas irradiadas con rayos gamma  $Co^{60}$ . A=testigo absoluto inoculado con agua destilada. B=0 Gy inoculado con *C. agavicola*. C=5 Gy. D=10 Gy. E=15 Gy. F=20 Gy. G=25 Gy y H=30 Gy**

La herencia de la resistencia poligénica es más compleja debido a que los genes que intervienen se dificulta identificarlos individualmente, conociéndose el efecto combinado de dichos genes como un todo que está asociada con genes menores de efectos aditivos que interaccionan con el ambiente (Russel, 1978).

Se presentaron cinco genotipos en los que no hubo presencia de lesión en la hoja, dos en la dosis de 20 Gy, dos en 25 Gy y una en la dosis de 30 Gy, que es una de las razones por las que los valores en porcentaje de las lesiones con respecto al testigo estuvieran por debajo del 10% con respecto al área infectada. Sin embargo las lesiones en estas dosis son significativamente menores a los tratamientos con menor dosis de radiación, así como con el tratamiento sin irradiar.

Un aspecto a considerar, es que de los porcentajes de infección, si bien la disminución en el tamaño de la lesión es progresiva con el incremento de la dosis de radiación, la diferencia en porcentaje entre el primer grupo (0 y 5 Gy) con el segundo grupo (10 y 15 Gy), oscila entre 5 y 10%; mientras que entre el primer grupo y el tercero (20, 25 y 30 Gy) es de 30% en promedio, lo que indica que hay un efecto acumulativo, y que estas dosis de radiación corresponden al valor de la dosis letal media  $DL_{50}$ .

García *et al.* (2000), estudiaron la variabilidad producida por las radiaciones Gamma para determinar la dosis óptima para los programas de mejoramiento de *Mussa* sp., cv. Gran Enano. Irradiaron brotes con dosis de 5 a 40 Gy con  $Co^{60}$ . Encontraron un aumento en la mortalidad a medida que aumentó la radiación, encontrando la  $LD_{50}$  entre 20 y 25 Gy con cambios en la altura de las vitroplántulas, la morfología y pigmentación, así como un bajo porcentaje de plántulas con un comportamiento superior frente a la Sigatoka negra en comparación con el testigo. El efecto de la radiación obtenido en el cv. Gran Enano, fue similar al que se presentó en las vitroplántulas de agave, ya que también la  $DL_{50}$  se encontró entre los 20 y 25 Gy, así como el comportamiento frente a la presencia del fitopatógeno.

Morela *et al.* (2002), indujeron variabilidad genética en caña de azúcar (*Sacharum* sp.), al inducir mutaciones con rayos gamma en callos cultivados *in vitro* para obtener genotipos resistentes al Virus Mosaico de la Caña de Azúcar (SCMV) a partir de variedades (B6749, B7987 y PR62258) susceptibles. Se irradiaron con  $Co^{60}$  (0,2; 4,8 y 12 Kr). Se regeneraron 3,502 plantas mismas que se inocularon cinco veces con la raza B del SCMV, preparado de hojas de la variedad C571, altamente susceptible. De las plantas regeneradas, 82% permaneció libre de síntomas. En campo de 1,607

plantas, 911 permanecieron sin síntomas, así de un 82% de las plantas que sobrevivieron a la inoculación artificial el 46% permaneció sin síntomas. Los resultados anteriores, muestran que hay una tendencia a que la resistencia que presentan los genotipos al ser inoculados en plántula, al evaluarse en campo no manifiesten los síntomas.

## CONCLUSIONES

Las pruebas de patogenicidad realizadas en las vitroplántulas irradiadas mediante hoja desprendida, no son concluyentes, debido a que los síntomas del tizón foliar presentaron un comportamiento diferenciado, que no permite identificar y seleccionar genotipos resistentes. La selección de genotipos mutantes ( $DL_{50} = 25$  Gy), debe hacerse una vez que las plántulas estén en maceta y adaptadas al medio ambiente, y así valorar el grado de resistencia para hacer la selección.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ayala, E. V., M. Yañez, Uwe, B. Johannes. 2005. *Cercospora agavicola* — a new foliar pathogen of *Agave tequilana* var. azul from Mexico. Mycotaxon 93: 115-121.
- CRT - Comité Técnico Agronómico. 2005. Plagas y enfermedades del *Agave tequilana* Weber, var. Azul. Edición Consejo Regulador del Tequila, A.C. Comité Técnico Agronómico (Subcomité de investigación). 124 p
- Chen, M.D.; Lyda S.D.; Halliwell, R.S. 1979. Environmental factors influencing growth and sporulation of *Cercospora kikuchii*. Mycologia 71: 1150-1157.
- Correa-Victoria, F.J. 2001. Induced Mutations to develop Sources of Resistance to Rice Blast, *Pyricularia grisea* Sacc. Proceedings of a Final Research Co-ordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Lima, Peru, 5–9 October 1998. pp 15-18
- García, L, I. Bermúdez, P. Orellana, N. Veitía, L. García, J. Clavero, C. Romero.2000. Inducción de mutaciones por radiaciones Gamma en el cultivo *in vitro* de brotes del cultivar Gran Enano (AAA). Biotecnología Vegetal 1: 45-50.

- González, H, J Del Real y Solís, J. 2007b. Manejo de Plagas del Agave Tequilero. Ed. Colegio de Postgraduados y Tequila Sauza, S.A de C.V. 123 p.
- Gosal, S. S., A. Das, J. Gopal, J.L. Minocha, H.R. Chopra and H.S. Dhaliwal. 1998. Induction of variability through radiations for late blight resistance and heat tolerance in potato. Proceedings of a final research Co-ordination Meeting. Shanghai, China. FAO/OIEA
- Groenewald, M. J., Z. Groenewald, and Corus, P. W.. 2005. Distinct Species Exist Within the *Cercospora apii* Morphotype. The American Phytopathological Society. Vol. 95, No. 8, 951-959.
- Madriz, O. K. 2002. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63 p. 22 - 32,
- Montes–Belmont, R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Micología 29: 73-82
- Morela, F., V. González, L. Castro y S. Castroni. 2002. Evaluación de la reacción al virus del mosaico en plantas de caña de azúcar provenientes de callos irradiados. Agronomía Tropical 52(3): 311-323 2002
- Pettitt, T.R., M. F. Wainwright, A. J. Wakeham and J. G. White. 2011. A simple detached leaf assay provides rapid and inexpensive determination of pathogenicity of *Pythium* isolates to ‘all year round’ (AYR) chrysanthemum roots Plant Pathology 60: 946–956.
- Russell, G.E. 1978. Plant Breeding for Pest and Disease Resistance. Butterworth & Co Publishers Ltd. London, U.K.
- Valdez, B.A. y P.Orellana 2004. Evaluación de la variabilidad fenotípica y selección temprana a roya de la caña de azúcar (*Puccinia melanocephala* H. & P. Syd) en plantas regeneradas a partir de callos irradiados de la variedad de caña de azúcar ‘SP 70-1284’. Biotecnología Vegetal 4: 201-205.

## CONCLUSIONES GENERALES

Las concentraciones de auxina (AIB) y Citocinina (Cinetina) fueron esenciales para la inducción de los brotes adventicios, así como en la morfogénesis para la obtención de plántulas con las características fenotípicas de *A. tequilana* a partir del cultivo *in vitro* de yemas axilares. Además el protocolo es una herramienta significativa en los programas de mejoramiento genético.

Las dosis de radiación absorbidas tuvieron un efecto negativo en el desarrollo de plántula y de callo en dosis superiores a 30 Gy.

La DL<sub>50</sub> se ubicó entre 20 y 25 Gy para la inducción de brotes adventicios y altura de plántula, y de 15 a 25 Gy para callo, incrementando la aparición de mutaciones favorables.

La inducción de variabilidad genética en vitroplántulas de *A. tequilana* a través de rayos gamma Co<sup>60</sup>, debe ubicarse entre 15 y 25 Gy, lo que incrementa la probabilidad de obtener mutaciones enfocadas a la resistencia a *C. agavicola*.

Se estableció el protocolo de embriogénesis somática indirecta en vitroplántulas de *A. tequilana* irradiadas con Co<sup>60</sup>, así como la viabilidad en la conversión en plántulas.

La radiación ocasionó cambios en el contenido genético (mutaciones) que redujeron significativamente la inducción de callo embriogénico, su desarrollo y la obtención de embriones somáticos.

Se pueden obtener plántulas genéticamente diferenciadas a partir de una célula, ya que los efectos de la radiación no se presentaron en la conversión de embriones a plántulas.

Los síntomas del tizón foliar en las vitroplántulas, tendieron a disminuir conforme la dosis de radiación se incrementó, lo que sugiere que puede estar presente un comportamiento genético aditivo, orientado a una resistencia horizontal.

Las pruebas de patogenicidad realizadas en las vitroplántulas mediante hoja desprendida, no son concluyentes para seleccionar genotipos resistentes a *C. agavicola*, por lo que la selección debe hacerse en genotipos mutantes (DL<sub>50</sub> = 25 Gy) una vez que las plántulas estén adaptadas al medio ambiente y las hojas estén maduras y lignificadas, y así valorar el grado de resistencia de acuerdo a la dosis de radiación, para hacer la selección.



## **ANEXOS**

## PRESENTACIONES ACADÉMICAS

INDUCCIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA EN AGAVE (*Agave tequilana* weber. var. Azul) A TRAVÉS DE RAYOS GAMMA Co<sup>60</sup>. XXII Semana de la Investigación Científica CUCBA. 2011. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Diciembre 2011.

MICROPROGAPACIÓN DE AGAVE (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) A TRAVES DE MERISTEMOS PARA FITOMEJORAMIENTO. XXII Semana de la Investigación Científica CUCBA. 2011. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Diciembre 2011.

DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL (DL50) EN VITROPLÁNTULAS DE *Agave tequilana* var. Azul CON Co60. Modalidad: Oral Clave: CNG2012 136. CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2012, Mazatlán, Sinaloa. 3, 4 y 5 de octubre de 2012.

MICROPROGAPACIÓN DE AGAVE (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) A TRAVÉS DE YEMAS AXILARES. Modalidad: Oral. Clave: CNG2012 137. CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2012, Mazatlán, Sinaloa. 3, 4 y 5 de octubre de 2012.

MUTACIONES SOMÁTICAS A TRAVÉS DE RAYOS GAMMA Co<sup>60</sup> EN PLÁNTULAS DE *Agave tequilana* var. Azul OBTENIDAS *in vitro*. . XXIII Semana de la Investigación Científica CUCBA. 2012. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Noviembre 2012.

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN PLÁNTULAS DE AGAVE (*Agave tequilana* Weber. var. azul) IRRADIADAS CON Co<sup>60</sup>. XXIII Semana de la Investigación Científica CUCBA. 2012. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Noviembre 2012.

OBTENCIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS A PARTIR DEVITRO PLÁNTULAS DE *Agave tequilana* Weber var. Azul IRRADIADAS CON Co60. Modalidad: Oral Clave: CNG2013 063. CONGRESO NACIONAL DE GENÉTICA 2013, Manzanillo, Colima. 2, 3 y 4 de octubre de 2013.

## BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Arizaga, S. 2008. En peligro el tequila mexicano. Lo que somos. Rvista electronica <http://www.loquesomos.org/amasando/elbicho/tequila.htm>.
- Aureoles, R. F., Rodríguez, J. L., Legaria, J. P., Sahagún, J. y Peña, M. G. 2008. Propagación *in vitro* del "maguey bruto" (*Agave Inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico Revista Chapingo Serie Horticultura. 14 (3): 253-269.
- Ayala, E. V., M. Yañez, Uwe, B. Johannes. 2005. *Cercospora agavicola* — a new foliar pathogen of *Agave tequilana* var. azul from Mexico. Mycotaxon 93: 115-121.
- Chen, M.D.; Lyda S.D.; Halliwell, R.S. 1979. Environmental factors influencing growth and sporulation of *Cercospora kikuchii*. Mycologia 71: 1150-1157.
- Consejo Regulador del Tequila (CRT). 2005. Plagas y Enfermedades del *Agave tequilana* Weber var. Azul. Edición Consejo Regulador del Tequila, A.C. Comité Técnico Agronómico (Subcomité de investigación). Guadalajara, Jalisco. México. 124 p
- Correa-Victoria, F.J. 2001. Induced Mutations to develop Sources of Resistance to Rice Blast, *Pyricularia grisea* Sacc. Proceedings of a Final Research Co-ordination Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Lima, Peru, 5–9 October 1998. pp 15-18
- 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
- Evans, D., W. Sharp and C. Flick. 1981. Growth and behavior of cell cultures, embryogenesis and organogenesis. En: Plant Tissue Cultura, methods and applications in agriculture. Thorpe, T (Ed) pp. 45-113. Academic Press. New York

- Freire, S. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biot. Veg.* 3 :195-209.
- García, L, I. Bermúdez, P. Orellana, N. Veitía, L. García, J. Clavero, C. Romero. 2000. Inducción de mutaciones por radiaciones Gamma en el cultivo *in vitro* de brotes del cultivar Gran Enano (AAA). *Biotecnología Vegetal* 1: 45-50.
- García, L. R., P. Orellana, L. García, J. Pérez, V. Rodríguez, I. Bermúdez, J. Clavero y C. Romero 2001. Empleo de la mutagénesis en la mejora al grosor del tallo del somaclón IBP 89-169 de caña de azúcar. *Biotec. Veg.* 2:71-75.
- González, G. S., M. Alemán, R. Garriga, C. de la Fe. 2007a Radio sensitivity to gamma rays ( $60^{Co}$ ) in shoot tips of henequen. *Biotec. Veg.* 7:115–117.
- 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, J Del Real y Solís, J. 2007b. Manejo de Plagas del Agave Tequilero. Ed. Colegio de Postgraduados y Tequila Sauza, S.A de C.V. 123 p.
- González, O.S., O. Sam, M. Hernández, M. Coronado y J. Silva. 2005. Caracterización Histológica de la Embriogénesis Somática a Partir de Limbos Foliare de Boniato (*Ipomoea batatas* L. Lam.). *Cultivos Tropicales*, vol. 26, no. 4, p. 37-41
- Gosal, S. S., A. Das, J. Gopal, J.L. Minocha, H.R. Chopra and H.S. Dhaliwal. 1998. Induction of variability through radiations for late blight resistance and heat tolerance in potato. Proceedings of a final research Co-ordination Meeting. Shanghai, China. FAO/OIEA
- Groenewald, M. J., Z. Groenewald, and Corus, P. W. 2005. Distinct Species Exist Within the *Cercospora apii* Morphotype. *The Am. Phytopathological Society.* Vol. 95, No. 8, 951-959.
- Hurtado de la P. S. 2008. Variabilidad Intraespecífica en *in vitro* *Agave tequilana* Weber var azul Detectada con Caracteres Morfológicos y Moleculares. Tesis Doctoral sin publicar. CUCBA, Universidad de Guadalajara, Jalisco. México.

- IAEA, International Atomic Energy Agency 1977 Manual of Mutation Breeding. 2nd. ed. Vienna, Austria. 288 p.
- Kleffel, B., F. Walter and W. Preil.. 1985. X-ray-Induce Mutability in Embryogenic Suspension Cultures of *Euphorbia pucherrima*: proceedings of a Symposim, Vienna, 19–23 August. pp: 113-120
- Lemus, Y., N. Méndez, J. Cedeño, V. Otahola 2002 Radio sensibilidad de dos genotipos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) a radiaciones gamma. Rev. Cient. UDO Agríc. 2:22-28.
- Madriz, O. K. 2002. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63 p. 2 2 - 3 2,
- Martín, A., A. Fernández y R. Mejía. 2011. Capacidad Embriogénica de Callos Inducidos en Ejes Embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 34 (2): 101–106.
- Martínez, P., M. Ortega, V. Chávez y R. Bye 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *A. victoria-reginae*: Considerations for its conservation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 74:135-142.
- Medina, C., I. García, M. Caro y F. Aristizába. 2007. Análisis AFLP de variación somaclonal en embriones somáticos de *Hevea brasiliensis*. Rev. Col. Cienc. Quím. Farm. Vol. 36 (1), 70-80.
- Montes–Belmont, R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Micología 29: 73-82
- Morela, F., V. González, L. Castro y S. Castroni. 2002. Evaluación de la reacción al virus del mosaico en plantas de caña de azúcar provenientes de callos irradiados. Agronomía Tropical 52(3): 311-323
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497
- Ngampongasai, S. W. Sriphisut and P Sruiyapan. (1992) Use of radiation and tissue culture techniques to induced mutation in sugarcane. In: Research Report Buri Field Crops Research Center. Dept. of Agriculture. Suphan Buri, Thailand. pp:133-143.

- 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.
- Novisel, V, L R García, I Bermúdez, P Orellana, Y Padrón, D. Torres. 2007. Efecto de las radiaciones gamma sobre callos de papa var. 'Desirée'. *Biotec. Veg.* 7:57-61.
- Otahola, G. V., M. Aray y A. Yira. 2001. Inducción de mutantes para el color de la flor en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* (Ram) Tzevelev) mediante radiaciones gamma. *Rev. Cient. UDO Agríc.* 1:56-63.
- Pettitt, T.R., M. F. Wainwright, A. J. Wakehamb and J. G. White. 2011. A simple detached leaf assay provides rapid and inexpensive determination of pathogenicity of *Pythium* isolates to all year round' (AYR) chrysanthemum roots *Plant Pathology* 60: 946–956.
- Portillo, L., F. Santacruz, A. Gutiérrez y B. Rodríguez. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *in vitro Cell. Dev. Biol.— Plant.* 43:569–575
- Reyes, C. P. 1978. *Diseño de Experimentos Agrícolas*. Primera Edición. Ed. Trillas 344.P
- Robles, S. R. (1986) *Genética Elemental y Fitomejoramiento Práctico*. 1ª ed. Ed. Limusa W. 475 p.
- Rodríguez, G. B. 2004. La materia prima *Agave tequilana* Weber var azul. *Avances de la Investigación en el Agave Tequilero*. Consejo Regulador del Tequila. P: 3-43
- Rodríguez, G.B., A. Gutiérrez and B. Acosta. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 46:85-87.
- Rodríguez, O., B. Pentiado y C. Valle. 2000. Embryo rescue of interespecific hybrids of *Brachiaria spp.* *Plant Cell Tissue and Organ Culture.* 61: 175-182
- Russell, G.E. 1978. *Plant Breeding for Pest and Disease Resistance*. Butterworth & Co Publishers Ltd. London, U.K.
- 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 and B. Rodríguez (1999) Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 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.
- Soltero, R, M F Nieto, C Ramírez. 1999. Embriogénesis somática en *Agave tequilana* Weber, hacia el mejoramiento genético. *In: VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, 12 al 17 de septiembre, Huatulco, Oaxaca. México. pp: 548.
- Street, H. 1977 *Plant Tissue and Cell Culture*. University of California Press. Second Edition. 614 p.
- Valdez, B A, P. Orellana, N. Veitía, y D. Torres. 2004a. Crecimiento, regeneración y radiosensibilidad de callos de caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido var. “SP 70-1284”) tratados con radiación gamma fuente  $^{60}\text{Co}$ . *Biotec. Veg.* 4:165-169.
- Valdez, B.A. y P. Orellana 2004b. Evaluación de la variabilidad fenotípica y selección temprana a roya de la caña de azúcar (*Puccinia melanocephala* H. & P. Syd) en plantas regeneradas a partir de callos irradiados de la variedad de caña de azúcar ‘SP 70-1284’. *Biotecnología Vegetal* 4: 201-205.