



ORGANOGENESIS INDIRECTA DE AGAVE PARVIFLORA, UNA ESPECIE EN PELIGRO Y CON ALTO POTENCIAL ECONOMICO

Anaya Dyck José María, Ochoa Meza Andrés, Martínez Heredia Damián y Moreno Salazar Sergio Francisco*

Departamento de Agricultura y Ganadería. Universidad de Sonora. Carretera a Bahía de Kino, Km. 21. Hermosillo, Sonora.

*Autor para correspondencia smoreno@guayacan.uson.mx

RESUMEN

Agave parviflora es endémica a Sonora. Esta especie se encuentra en status de protección especial, debido a que anteriormente se explotaba de manera indiscriminada en la elaboración del que se supone era uno de los destilados más finos de agave, la Tahuta. Se desarrolló una metodología *in vitro* para la propagación masiva de ésta especie. La técnica empleada fue la multiplicación a través de tejido de callo. Mediante un diseño completamente al azar en arreglo factorial 3^3 , se evaluaron 3 niveles de BA, 3 niveles de 2,4-D y tres tipos de explantes (raíces, tallos y hojas de plántulas de semilla). Se utilizó el medio MS. En general a mayor concentración de reguladores de crecimiento hubo mayor producción de biomasa, callos mejor formados y de color verde intenso. Las mejores respuestas se observaron en tejido de tallo. El tratamiento más efectivo fue MS conteniendo 11.1 μM de BA y 5.61 μM de 2,4-D. Posteriormente para la diferenciación y formación de brotes, se empleo un diseño 3×2 , evaluando el efecto de 3 concentraciones de BA y 2 de 2,4-D. Se observó que el tratamiento de 22.2 μM de BA y 1.13 μM de 2,4-D generó mayor cantidad de embriones e índice de brotación. Los brotes generados se enraizaron en medio MS libre de reguladores de crecimiento y las plántulas se aclimataron en arena estéril usando una cámara de crecimiento con luz continua y fotoperiodo de 12 h. La supervivencia de las plantas enraizadas fue cercana a 100%.

Palabras clave: *Agave parviflora*, organogénesis indirecta, callo.

INTRODUCCIÓN

Agave parviflora Torr. es una especie endémica a nuestra región. Esta especie se encuentra en status de protección especial, debido a que a principios del siglo pasado, se explotaba de manera indiscriminada en la elaboración del que se supone era uno de los destilados más finos de agave, la tahuta, tahutita ó sóbari en opata. En este trabajo se desarrolló una metodología *in vitro* para la propagación masiva de dicha especie, útil en la obtención de plantas para futuros programas de repoblación y cultivo intensivo.

Testimonios de antiguos vinateros han revelado que la tahuta era una bebida de calidad superior a cualquier otro destilado de agave. Incluso se ha mencionado que algunos productores agregaban una cierta cantidad de *Agave parviflora* a un lote de cabezas de *Agave angustifolia* (maguey de bacanora) a fin de mejorar las propiedades organolépticas del bacanora, la bebida tradicional por excelencia en Sonora.

Aunque el hábitat de *A. parviflora* abarca todo el desierto de Sonora-Arizona(<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=AGPA5>, http://www.centerforplantconservation.org/collection/CPC_ViewProfile.asp?CPCNum=49), en nuestros recorridos de campo solo hemos detectado pequeñas poblaciones de unos cuantas decenas de individuos en Moctezuma, Ures, Mazatán y Nácori Chico.

Agave parviflora basa su nombre en la morfología de sus flores, que son las más pequeñas de su género. Es también la más pequeña de las especies de *Agave* en el desierto de Sonora-Arizona. Se compone de un pequeño rosetón que mide de 10 a 25 cm de alto y de 15 a 20 cm de ancho. Con un único o ningún brote. Sus hojas son de 6 a 20 cm de largo y 0.8 a 2 cm de ancho. Poseen un color verde oscuro con un recubrimiento ceroso y atractivas marcas blancas en ambas superficies y márgenes de la hoja. Dichas marcas, son solo el resultado de la impresión de las yemas en desarrollo de la hoja y se encuentran al centro de la roseta, mientras que en los bordes exteriores de los márgenes de las hojas se desprenden fibras blancas. Por estas características también ha sido usada como planta de ornato, atractiva para los coleccionistas, ya que estas plantas son muy apreciadas en

interiores o como decoración en jardines.

Debido al metabolismo ácido de las crasuláceas, esta planta está muy bien adaptada al medio desértico en el que vive y posee alta tolerancia al calor. Resiste una exposición total al sol y requiere de poca agua para sobrevivir. Además, quizá debido a la acumulación de inulina (principal polisacárido de agaves), presenta alta resistencia al congelamiento, pudiendo sobrevivir hasta a -12°C . De igual forma que la mayor parte de plantas de su género, *Agave parviflora* es monocárpica, lo que significa que toma varios años de desarrollo antes de su único evento de producción de flores y semillas, posterior al cual viene la senescencia y su muerte.

El *Agave parviflora* tiene su floración entre los 10 y los 25 años de edad. Su inflorescencia mide de 1 a 2.5 m de altura. El tallo floral es delgado y su color varía entre verde y rojizo. Sus flores son pequeñas de 14 a 27 mm de longitud, de color crema o amarillo y se encuentran en pequeños racimos con 1 a 4 flores. Sus frutos maduros son pequeñas cápsulas ovoides de 6-20 mm de diámetro. Las semillas son semi-redondas y en forma de cuña. Las semillas tienen 3 mm de largo y 2.5 mm de ancho. Las flores maduran de fines de primavera al verano, y son polinizadas por abejorros y abejas carpintero. Las semillas son liberadas gradualmente de las capsulas secas del fruto durante el otoño y el invierno.

Además de su explotación artesanal y ornamental, existen otras amenazas que han afectado seriamente las poblaciones silvestres de *Agave parviflora*; el ganado se come sus inflorescencias, la pérdida de hábitat debido a la minería y la construcción de carreteras y, la degradación del hábitat debido al pastoreo. Estos factores agravan aún más la situación de la especie, si se toma en cuenta su baja tasa de crecimiento y de propagación.

Por otro lado, la deprimida economía de las zonas serranas del Estado de Sonora, hace imperante el desarrollo de nuevos productos de calidad y alto valor comercial, que sean reconocidos por el mercado nacional e internacional. Unos de estos productos podrían ser tanto las plantas de *Agave parviflora*, como la bebida que se obtiene de él. En este

sentido, ante el estado actual que guardan las poblaciones silvestres del recurso es importante desarrollar su tecnología de cultivo, pero previamente hay que implementar las técnicas de propagación, que permitan una rápida reproducción de plantas. Una alternativa viable para generar cientos de miles de plantas en tiempos relativamente cortos, es el cultivo de tejidos *in vitro* (Zimmerman, 1993).

Los métodos de cultivo de tejidos *in vitro* más comunes consisten en la fragmentación de nudos, ápices y yemas axilares, los cuales son manipulados en condiciones asépticas y transferidos al medio de cultivo, para posteriormente inducir, mediante una concentración adecuada de reguladores de crecimiento, su proliferación y posterior subcultivo de brotes *in vitro*. Estas metodologías permiten la obtención de plantas genéticamente similares a una velocidad de producción considerablemente superior a cualquiera de los métodos tradicionales. Estas técnicas en realidad son extensiones de los métodos convencionales de propagación clonal, pero llevadas a cabo a escala miniatura, bajo condiciones asépticas, razón por la cual a este tipo de propagación clonal, se le conoce como micropropagación (Dodds y Roberts, 1990). También se han desarrollado técnicas como la organogénesis directa a partir de células somáticas (no apicales) del explante y la embriogénesis/organogénesis indirecta pasando por tejido de callo. La organogénesis indirecta, implica la producción masiva de plántulas a partir de embriones u órganos inducidos en tejido de callo. La proliferación de callos a partir de un explante en particular, es el resultado de la activación mitótica de un pequeño grupo de células colocadas normalmente en la superficie de corte del explante. Todos los vegetales por si mismos poseen un potencial endógeno para la formación de callo, dado que en forma natural, al recibir una lesión en algún órgano, esta puede ser reparada por este tipo de tejido. Sin embargo dichas respuestas se manifiestan en diferentes grados entre las distintas especies. El cultivo de callo con la consecuente organogénesis o embriogénesis somática es una herramienta valiosa para la obtención de variación somaclonal en diferentes especies.

Toda técnica de micropropagación implica al menos tres etapas básicas:

I) Establecimiento del cultivo. Implica: a) la obtención del explante de una planta maternal previamente seleccionada de una población, en base a sus características fenotípicas y

genotípicas, b) la preparación del explante (poda, limpieza, esterilización y lavado) y c) Establecimiento y desarrollo inicial en un medio apropiado.

II) Multiplicación. Se refiere a la transferencia de los rebrotes a un medio de cultivo apropiado para multiplicación masiva, o bien para la rápida formación de embriones o rebrotes.

III) Transferencia a su ambiente normal. Involucra: a) la transferencia de los rebrotes a medios de enraizamiento y b) el paso de las plántulas obtenidas a suelos esterilizados o a medios artificiales, para su fortalecimiento acondicionamiento gradual a las condiciones naturales (por ejemplo la reducción gradual de la humedad (Hurtado y Merino, 1988).

En base a lo anterior, este trabajo tiene como finalidad establecer una metodología para La propagación masiva de la planta de *Agave parviflora*, mediante las técnicas de cultivo de tejidos y está orientado hacia la obtención de germoplasma con fines de manipulación genética y cultivo intensivo para su explotación industrial, así como para repoblación en su hábitat natural.

Material y Métodos

Material vegetal utilizado

Como fuentes de explante, se utilizaron plántulas de *Agave parviflora* de un mes y medio de edad, obtenidas mediante la germinación de semilla. Dichas semillas fueron colectadas en el Rancho el Bajío situado en el municipio de Nácori Chico. Ya en el laboratorio, se seleccionaron las semillas con características viables (bien formadas, rígidas, y de color negro) y se sometieron a un proceso de esterilización que incluyo las siguientes operaciones: inmersiones por 10 minutos en una solución al 70% de alcohol etílico, seguida de una inmersión en hipoclorito de sodio al 2.5% por espacio de 30 minutos y 3 lavados consecutivos en agua destilada-deionizada estéril. Una vez esterilizadas las semillas se sembraron en cajas de Petri, conteniendo el medio base de Murashighe & Skoog (MS), conteniendo 3 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar. Enseguida las cajas se pasaron a incubación bajo condiciones de oscuridad a 28°C. Una vez que las plántulas emergieron, desarrollaron su primer par de hojas y alcanzaron una talla de 3-5 cm, se procedió a tomar los explantes.

Método de multiplicación

La técnica de multiplicación estudiada fue la regeneración de brotes a partir de tejido de callo. Para la producción de tejido de callo, se utilizó un diseño completamente al azar en arreglo factorial 3³. Como explantes se utilizaron segmentos de: a) hoja, b) raíces y c) tallos, de las plántulas germinadas. Se utilizó MS como medio de cultivo y se probaron tres concentraciones (1.13, 3.39 y 5.61 μM) de Acido 2-4 Diclorofenoxiacético (2,4-D) y tres concentraciones (2.22, 6.66, 11.1 μM) de Bencil Adenina (BA)

La producción de embriones e inducción de brotes en callo proveniente de tejido de tallo, se manejó en un ensayo de 3x2, con y sin 2,4-D e incrementando 10 veces los niveles de BA, respecto a los tratamientos de inducción de callo (Cuadro 1).

Cuadro 1.- Tratamientos usados para organogénesis en callo de proveniente de tejido de tallo *Agave parviflora*

Tratamiento	2-4 D (μM)	BA (μM)
1	0	22.2
2	0	66.6
3	0	111.0
4	1.13	22.2
5	1.13	66.6
6	1.13	111.0

Sembrado y crecimiento

La siembra de los explantes se realizó en condiciones de asepsia utilizando una cámara de flujo laminar y el cultivo se desarrolló en una cámara de crecimiento controlado a 25 °C y fotoperiodo de 12 h.

Variables Respuesta

Como variables respuesta se analizó la biomasa de callo producido usando una escala arbitraria, donde se clasificó la cantidad de biomasa en cuatro rangos (muy alta, alta, media y baja) de acuerdo con el crecimiento relativo al explante inicial. Se registraron también las características del callo producido en cuanto a coloración, apariencia y capacidad para generar embriones. La capacidad de desarrollo de brotes u organogénesis, se evaluó contabilizando el número de brotes por explante cada mes.

Resultados

Los resultados del experimento de producción de callo, mostraron que entre más alta fue la concentración de reguladores de crecimiento, mayor fue la producción de masa de callo, también el callo obtenido fue mas turgente y de un color verde más intenso (Cuadro 3). Por otra parte se observó que los segmentos de tallo resultan ser mejores explantes que los de hoja, y éstos que los de raíz. Respecto de los segmentos de raíz, se encontró que la mayoría se oxidan y pierden su viabilidad antes de generar callo.

De acuerdo con los resultados mostrados en el cuadro 3, es posible observar que el mejor tratamiento para la producción de callo fue el correspondiente a 5.61 μ M de 2.4-D y 11.1 μ M de BA.

Cuadro 2.- Reguladores de crecimiento, producción de biomasa de callo y sus características en explantes de tallo de *Agave parviflora*.

Regulador de crecimiento (μ M)		Biomasa de callo	Características del callo
2.4 -D	BA		
1.13	2.22	baja	café necrótico, sin embriogénesis
1.13	6.66	baja	café, sin embriogénesis
1.13	11.1	media	verde amarillento baja embriogénesis
3.39	2.22	baja	café necrótico, sin embriogénesis

3.39	6.66	media	amarillo, sin embriogénesis
3.39	11.1	alta	verde amarillento, baja embriogénesis
5.61	2.22	regular	verde, alta embriogénesis
5.61	6.66	alta	verde oscuro muy alta embriogénesis
5.61	11.1	muy alta	verde obscuro, muy alta embriogénesis

Al finalizar la etapa de producción de callo, se modificó la concentración de reguladores de crecimiento, para los tratamientos diseñados para producir diferenciación, como se indicó en la sección de materiales y métodos. Respecto de la capacidad para generar nuevos órganos a partir del callo, se encontró que los tratamientos con 1.13 μ M de 2,4 -D son los que propiciaron la mayor producción de brotes y raíces (Cuadro 4), mientras que los callos sin éste regulador de crecimiento, por lo general se tornaron de color amarillento u oscuro y murieron (datos no mostrados). La concentración de 22.2 μ M de BA resultó más favorable para este proceso.

Cuadro 3.- Reguladores de crecimiento y organogénesis en tejido de callo de *Agave parviflora*

2,4 -D (μ M)	BA(μ M)	Número de brotes/mes ^a
1.13	22.2	11
1.13	66.6	2
1.13	111.0	3

^a Promedio de al menos 3 repeticiones por mes de subcultivo.

De acuerdo con los resultados obtenidos es posible concluir que se puede lograr la organogénesis indirecta en *Agave parviflora*, donde los segmentos de tallo resultan ser los más apropiados para iniciar la propagación *in vitro*. Además se observó que la concentración de 2,4-D es importante para regular este proceso. Respecto de la organogénesis resulta importante la adición de BA, cuya interacción con 2,4-D resulta en una mayor diferenciación de brotes; sin embargo niveles altos del primero disminuyen la capacidad de generar brotes en el callo.

BIBLIOGRAFIA

- http://www.centerforplantconservation.org/collection/CPC_ViewProfile.asp?CPCNum=49.
Center for plant conservation, national collection plant profile, agave parviflora.
Visitada el 20 de febrero de 2010.
- A.F.G. DIXON, P. KINDLMANN (1994) Optimum body size in aphids *Ecological Entomology*.
- Dodds J. H. y Roberts R. W. 1985. *Experiments in plant tissue culture*. Ed. Cambridge University Press.
- Gentry A. 1982. Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations. or an accident of the Andean orogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 69: 557-593.
- Hurtado D.V. y M.E. Merino M. 1988. *Cultivo de Tejidos Vegetales*.
- Zimmerman J.L. 1993. Somatic Embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5:1411-1423.
- <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=AGPA5>
- <http://www.tropicalcentre.com/agave/agaveparviflora/agaveparviflora.htm>
- <http://swbiodiversity.org/seinet/taxa/index.php?taxon=3063>
- <http://www.dbg.org/index.php/plan/ourgarden/gardengalleriescollections/speciespages/agav>

eparviflora

http://www.desert-tropicals.com/Plants/Agavaceae/Agave_parviflora.html

http://www.centerforplantconservation.org/collection/CPC_ViewProfile.asp?CPCNum=49