

Micropropagación de *Agave wendtii* Cházaro (1995) (Agavaceae), una especie endémica del Uxpanapa, Veracruz, México

J.A. García-Pérez¹, M. Cházaro-Bazañez¹, R.V. Ortega-Ortiz¹, T. F. Carmona-Valdovinos¹, B.L. Náder-García^{1*}

¹Universidad Veracruzana, Facultad de Biología, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, C.P.91090, Xalapa, Veracruz, México

*bnader@uv.mx, tavlya@yahoo.com

Área de Participación: Ingeniería Química

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo el desarrollo de un protocolo de micropropagación *in vitro* de una especie de *Agave* endémico para México, *Agave wendtii*. Se realizaron experimentos para: 1) determinar condiciones óptimas para la germinación de semillas; 2) determinar condiciones óptimas de reguladores de crecimiento (RC) y luz para la organogénesis (formación de callos, brotes y raíz), y 3) determinar un sustrato adecuado para el desarrollo de plántulas en invernadero. El medio sólido MS, expuesto a condiciones de luz constante, presentó una germinación del 100% y, sus correspondientes plántulas, fueron las únicas que desarrollaron rizoides blancos y gruesos. La proporción de brotes más alta (3.1 brotes por explante) se obtuvo a una concentración de 1.5 mg/L de 2,4-D más 0.5 de BAP, y solamente los brotes individualizados produjeron raíz después de haber retirado cualquier regulador. El mejor sustrato para la aclimatación de plántulas fue el de lombricomposta más arena. Se concluye que la técnica desarrollada en esta investigación puede usarse para la producción masiva de *A. wendtii* con fines de conservación.

Palabras clave: Micropropagación, brote callogénico, embriogénesis somática, organogénesis

Abstract

This study addresses the development of an *in vitro* micro propagation protocol for a species of *Agave* endemic to Mexico, *Agave wendtii*. Experiments were realized for: 1) determination of optimal conditions of culture media for seed germination, 2) determination of optimal regulators and light conditions for organogenesis (formation of shoots, callus and roots), and 3) determination of a suitable substrate for the development of greenhouse seedlings. The highest germination percentage (100%) was recorded at solid MS medium exposed to constant light conditions, and their corresponding seedlings were the only one which developed white and thick rhizoids. The highest shoot and callus proportion was obtained to a concentration 1.5 mg/L of 2, 4-D plus 0.5 de BAP. Only the individualized shoots laid roots after having omitted any regulator. The best substrate for seedlings acclimation was the vermicompost plus sand. It was concluded that the mass production of *A. wendtii* can be carried out with the protocol developed in this study.

Key words: Micropropagation, callogenic shoots, somatic embryogenesis, organogenesis

Introducción

Debido a su reciente descubrimiento en 1983 en el valle del Uxpanapa, *Agave wendtii* no está registrada como una especie amenazada en la norma oficial [NOM-059-SEMARNAT-2010]. Sin embargo, esta es una especie difícil de hallar en su hábitat natural y no se tienen registros de distribución en otras regiones, por lo que puede considerarse como una especie micro endémica y amenazada. Tampoco se conocen estudios sobre su biología o ecología y, desde que se colectó por primera vez, las semillas tuvieron que esperar hasta ocho años para su floración, y un año más para su fructificación, lo que podría explicar lo escaso de sus poblaciones. A pesar de que los *Agaves* en general producen cientos de semillas, la disponibilidad de humedad en campo puede limitar su germinación y sobrevivencia durante el primer año y, de hecho, solo

alrededor de 1% de los agaves se propaga por semilla y el 99% por brotes y bulbillos. Además, sus pequeñas tasas de desarrollo, hacen que a una plántula le tome entre 10 a 30 años alcanzar se etapa adulta [Nobel, 1998], y esto, junto con la sobreexplotación de poblaciones silvestres, son factores limitantes para su viabilidad ecológica. Debido a esto, y al alto potencial comercial-ornamental de *A. wendtii*, el desarrollo de un protocolo para su micropropagación *in vitro* podría auxiliar a superar estas restricciones con fines de repoblación de hábitats o para cultivos artificiales [Araya y col. 2000; Ramírez Tobías y col. 2012]. El cultivo *in vitro*, se define como un conjunto de técnicas para el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta (ex plantes), desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones axénicas artificiales y controladas en un medio nutritivo conteniendo vitaminas y reguladores de crecimiento (RC) tales como auxinas y citocianinas [Santacruz-Rubalcaba y col. 1999; Valenzuela-Sánchez y col. 2006; Domínguez Rosales 2008; Garnica y Pérez, 2010]. A partir de segmentos caulinares y foliares, bulbos, semillas, callos, meristemos, yemas y embriones cigóticos [Martínez y Pacheco, 2006], podrían producirse miles de plantas genéticamente similares [Abreu y col. 2007], y para ello, se han desarrollado medios de cultivo apropiados [Gamborg, 1968; Domínguez-Rosales y col. 2008; Santos-Valencia, 2009; Santacruz-Ruvalcaba y col. 1999]. También, se conocen los requerimientos de luz para la germinación de semillas [Araya y col. 2000] y de sustratos adecuados para la aclimatación de plántulas de algunas especies [Santos-Valencia, 2009]. En este estudio se desarrolló un protocolo eficiente para la propagación *in vitro* de *A. wendtii* mediante una secuencia de ensayos experimentales para optimizar su germinación, organogénesis y aclimatación de plántulas.

Materiales y Métodos

Obtención de semillas

Las semillas para el estudio, se donaron por el Dr. Miguel Cházaro Bazañes de la Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, México. Se utilizaron dos frutos de una planta creciendo en el Museum of Huntington en 2011 obteniéndose 60 semillas que fueron envueltas en papel de estraza y guardadas a temperatura de 26 ± 2 °C.

Desinfestación de semillas

Las semillas se lavaron con agua corriente y jabón, luego se trataron con fungicida (Funlate ®) 3g/L por 2h, y se incluyeron en una solución de cloro (Cloralex®) al 25%, más tres gotas de Bactrin, H24®, y una gota de polisobato 20 (Tween 20®) durante 20 min, todo esto en agitación constante. Al final, se realizaron cuatro lavados con agua esterilizada por 4 min cada uno.

Experimentos

Se realizaron una serie de experimentos secuenciales de un solo factor completamente aleatorizados (Tabla 1) para la optimización de una técnica de cultivo *in vitro* de *A. wendtii*.

Tabla 1. Experimentos efectuados para la optimización de una técnica de cultivo *in vitro* de *A. wendtii*

Experimento	Medio cultivo	de	Tratamientos	Unidad experimental	Réplicas
Germinación semillas (15 días)	Medio sólido	MS	Luz (MSSL)/oscuridad (MSSO)	1 semilla por frasco o tubo de ensayo	15/15
Germinación semillas (15 días)	Medio líquido	MS	Luz (MSLL)/oscuridad (MSLO)	1 semilla por frasco o tubo de ensayo	15/15
Inducción de callo meristemático	Medio líquido	MS	0.5, 1.0 y 1.5 mg/L de 2,4-D + 0.5 mg/L BAP, y el tratamiento control	Tres ex plantes de hojas de vitro-plantas (1 cm x 1 cm)	10
Obtención de	Medio	MS	0.5, 1.0 y 1.5 mg/L	Tres brotes	10

brotos a partir de callo	líquido		de 2,4-D + 0.5 mg/L BAP, y el tratamiento control		
Enraizamiento	Medio líquido	MS	0.5mg/L, 1.0mg/L y 1.5mg/L de IBA + 0.5 mg/L de 6-bencilaminopurina y el tratamiento control	Un brote	10
Aclimatación, duración = 60 días			1) 30% lombricomposta + 70% arena; 2) 30% lombricomposta + 70% grava; y 3) 30% lombricomposta + 70% tepezil.	Una vitro-planta con 5 hojas y 5 o más cm de longitud y con raíz	8

Las semillas germinadas *in vitro*, se sub-cultivaron para evitar pérdida por agotamiento del medio de cultivo, espacio, o fenolización. El porcentaje de semillas germinadas, se estimó según Arriaga y col. [1994] y la emergencia de la radícula fue tomada como criterio de germinación. El crecimiento se cuantificó mediante mediciones diarias de la altura de la plántula en centímetros (cm), durante 35 días. Las plántulas *in vitro* que no generaron raíz fueron sub-cultivadas en medio MS adicionado con 0.5 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de IBA. Las condiciones de los experimentos de inducción de callo y obtención de brotes fueron: luz constante (24h) con lámparas fluorescente de 2000 lux, humedad relativa de 80–90% y temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Los brotes obtenidos se individualizaron en medio fresco con las mismas concentraciones de 2, 4-D y de BAP. Cuando las vitroplantas no desarrollaron raíces, se sometieron a la acción combinada de IBA y BAP a diferentes concentraciones (0.5 mg/L, 1.0 mg/L y 1.5 mg/L más 0.5 mg/L, respectivamente). En cuanto a las vitro plántulas que generaron raíz, estas se lavaron con agua des ionizada estéril, e incluidas en solución bactericida (tres gotas por 50 mL de Bactrin, H24®) y solución fungicida (Funlate 3g/L) por 10 min. Todos los sustratos se esterilizaron en autoclave y las plantas se sembraron en bolsas de polietileno de 10 x 15 cm (60 g de sustrato). Cada tercer día, durante 60 días, se hicieron tres irrigaciones con medio MS ½ líquido (libre de vitaminas y sacarosa) para forzar a la plántula a generar sus nutrientes. Posteriormente se realizaron tres irrigaciones adicionales cada seis días con medio MS 1/4. Una semana después de la última irrigación, las bolsas protectoras se perforaron para permitir el flujo moderado de aire y dos semanas más tarde, éstas, se removieron y la irrigación se continuó con agua corriente.

Análisis de datos

La comparación del porcentaje total de semillas germinadas entre tratamientos se hizo mediante un modelo lineal generalizado (GLM) con errores binomiales [Crawley, 2007]. El efecto en el número de brotes se analizó con el estadístico Chi-cuadrada [Zar, 1999] y un modelo Lineal Generalizado (GLM) con errores Poisson [Crawley, 2007] se utilizó para analizar el efecto de los sustratos en el número de hojas en el experimento de aclimatación. Los análisis se efectuaron con el software Statística [Starsoft, 2012] y en el paquete R.

Resultados y discusión

La técnica de des infestación de semillas de *A. wendtii* fue satisfactoria, y no hubo contaminación de semillas durante el proceso de germinación como fue mostrado por Garnica y Pérez [2010] para el cultivo *in vitro* de cactáceas y agaváceas. La Figura 1 muestra que el tratamiento con medio MS basal expuesto a luz (MSSL) mostró la mayor proporción de germinación (100%) y fue diferente con respecto a los tratamientos en medio líquido-luz/oscuridad ($P < 0.05$).

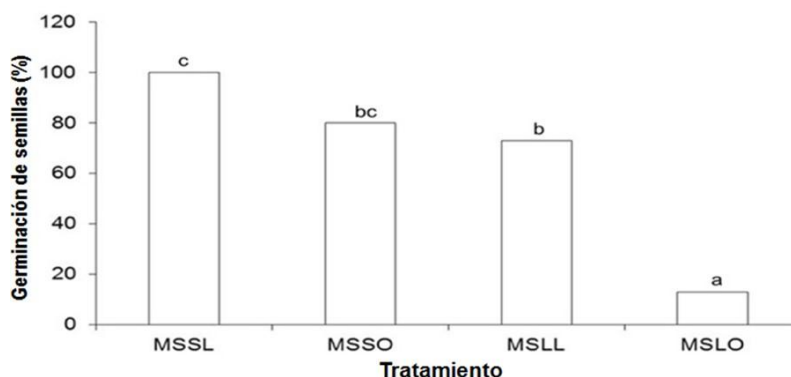


Figura 1: Porcentaje de germinación de semillas de *Agave weddellii* en cuatro tratamientos. Diferentes literales indican diferencias estadísticas significativas, $P < 0.05$.

Esto representa una mejora en la eficiencia de la germinación comparada con el 88% obtenida para *Agave warelliana* Gamborg [Santos Valencia, 2009], lo cual señala la especificidad de los requerimientos para las especies.

Las semillas en medio MSSL, fueron vigorosas y de color verde brillante, con rizoides delgados y blancos, mientras que las semillas en medio MSSO se tornaron flácidas, amarillentas y con rizoides delgados. Sin embargo, la altura promedio alcanzada durante los 30 días de monitoreo fue estadísticamente similar en ambos tratamientos (Figura 2).

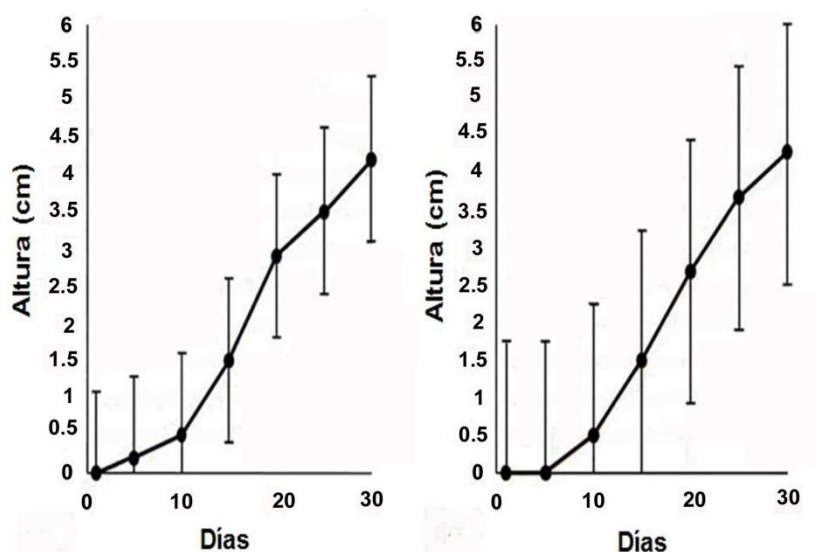


Figura 2: Crecimiento de *Agave weddellii* en condiciones de luz y oscuridad. Los valores son media $\pm$ error estándar.

Las plántulas germinadas en medio MSLL fueron vigorosas y de color verde intenso pero no generaron raíz, mientras que solo dos semillas en medio MSLO germinaron aunque sus plántulas no crecieron después de la emergencia de la radícula. En cuanto a los brotes, la concentración a 1.5 mg/L de 2,4-D produjo el doble y el cuádruple que el resto de los tratamientos (Figura 3), tal que a los 60 días se registraron 93 brotes con un promedio de 3.1 brotes para ex plante.

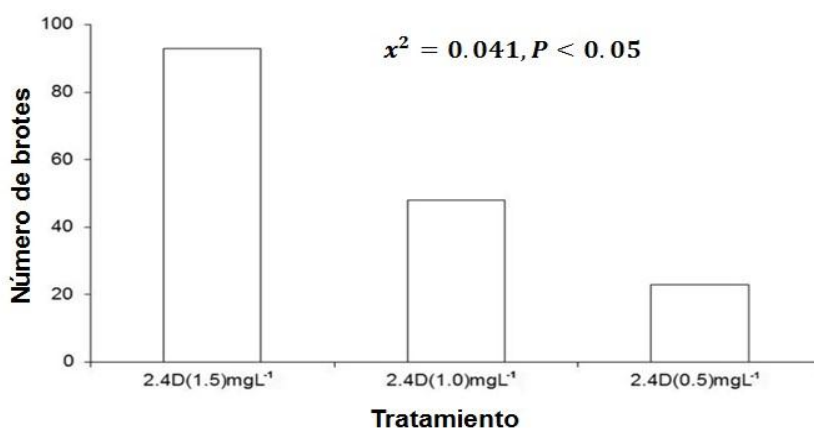


Figura 3: Efecto de la concentración de 2,4-D en el número de brotes de *Agave wendtii*. La prueba de chi-cuadrada indicó una proporción de brotes de 2:1:05 de izquierda a derecha ($P < 0.05$).

Los brotes individualizados produjeron plántulas con 4-5 hojas sanas, pero sin raíz. Valenzuela y col. [2006] también lograron la organogénesis de *Agave tequiliana*, pero esta requirió de la combinación de NAA y 2,4-D. La combinación de IBA y BAP pareció haber inhibido el desarrollo de la raíz, sin embargo, los controles en medio MS sin RC, produjeron el 60% de plántulas enraizadas a los tres meses. Esto coincide con lo reportado por Santacruz-Ruvalcaba y col. [1999] para *A. parrasana* y con López-Isabel [2017] para *A. tittanota*, pero no para *A. angustifolia* donde se requirió de 1.0 mg/L de IBA para el enraizamiento [Enríquez del Valle y col. 2005], evidenciando de nuevo la especificidad de requerimientos.

Finalmente, el modelo GLM predijo adecuadamente el número promedio de hojas en el experimento de aclimatación, tal que la combinación lombricomposta más arena fue el mejor tratamiento (Figura 4). Este resultado es comparable al éxito relativo obtenido con *Agave difformis*, *A. obscura* y *A. potatorum* [Domínguez Rosales y col. 2018] donde se probó como sustrato 30% lombricomposta y 70% de arena.

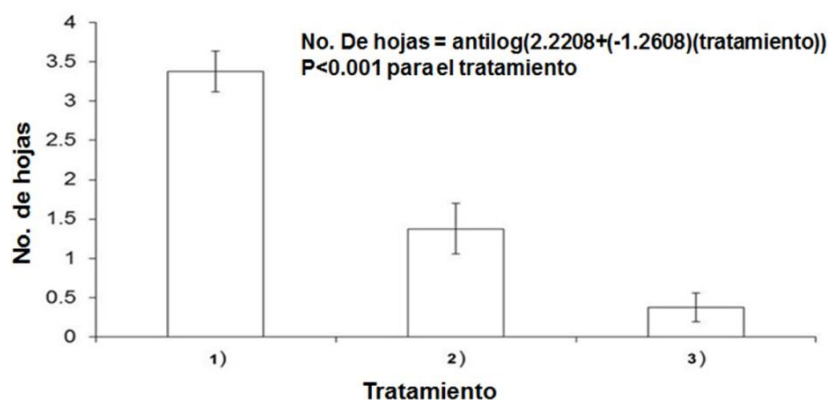


Figura 4: Efecto de tres sustratos (1) lombricomposta + arena, (2) lombricomposta + grava, (3) lombricomposta + tepezil sobre el número de hojas de *Agave wendtii*. Los valores son media $\pm$ error estándar

Conclusiones

El protocolo de desinfestación de semillas fue exitoso ya que no se presentó contaminación alguna durante el proceso. Asimismo, se obtuvo un 100% de germinación en el medio MS basal expuesto a la luz constante. La combinación de 1.5 mg/L de 2,4-D más BAP promovió una mejor formación de calo y un mayor número de brotes (3.1 brotes por ex plante), mientras que el enraizamiento solo requirió de medio MS basal. Finalmente, para la aclimatación de plántulas, la combinación de lombricomposta más arena (3:7) fue el mejor tratamiento, sin embargo, se propone realizar ensayos adicionales en el que se varíe la proporción de arena para incrementar el éxito.

Referencias Bibliográficas

1. Abreu, E., González, G., Ortiz, R., Rodríguez, P., Domech, R. y Garriga, M. (2007). Aclimatación de plantas de henequén micropropagadas (*Agave fourcroydes* Lem.). Estudio de diferentes condiciones en la etapa de vivero. *Información Técnica Económica Agraria* 103 (2): 101-106.
2. Araya, E., Gómez, L., Hidalgo, N. y Valverde, R. (2000) Efecto de la luz y del ácido giberélico sobre la germinación *in vitro* de jaul (*Alnus acuminata*). *Agronomía Costarricense* 24(1): 75-80.
3. Arriaga, M., Cervantes, V. y Vargas, A. (1994) Manual de reforestación con especies nativas: colecta y preservación de semillas, propagación y manejo de plantas. 1ª edición. Instituto Nacional de Ecología, SEDESOL, UNAM. México, D.F. 179 p.
4. Crawley, J. Michael. (2007) The R book. John Wiley & Sons, Ltd. 611 p.
5. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial. (30 de diciembre de 2010). México, D. F.
6. Domínguez-Rosales M., González-Jiménez, M., Rosales-Gómez, C., Quiñones-Valle, C., Delgadillo-Díaz de León, S., Mireles-Ordaz, S., Molphe-Bach, E. (2018) El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 41: 53-62.
7. Enriquez del Valle, J., Carrillo-Castañeda, G. y Rodríguez-de la O, J. (2005). Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28: 175-178.
8. Gamborg O., Miller R., Ojima K. (1968) Nutrient requirement of suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*. 50: 151-158.
9. García-Herrera E., Méndez-Gallegos S., Talavera-Magaña D. (2009) El género *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecológica. *RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición*, Edición Especial 5: 20-10.
10. Garnica, R. y Pérez, E. (2010) Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas, agaváceas, noliáceas y especies forestales. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 58: 12-20.
11. López-Isabel, B. (2017) Multiplicación *in vitro* y aclimatación de *Agave titanota* Gentry, especie sujeta a protección especial. Tesis de maestría en Ciencias Agropecuarias. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana. Xalapa, México. 73 pp
12. Martínez, A., Pacheco, C. (2006) Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. *Agronomía Colombiana* 24 (2): 207-213.
13. Murashige, T and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15 (3): 473-497.
14. Nobel, P. S. (1998) Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge: Cambridge University Press.
15. Ramírez-Tobías, H. M., Niño-Vázquez, R., Aguirre-Rivera, J. R., Flores, J., De Nova-Vázquez, J. A. y Gálvez, R. J. (2012). Seed viability and effect of temperature on

- germination of *Agave angustifolia* subsp. *tequilana* and *A. mapisaga*; two useful *Agave* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* 63 (5): 881-888.
16. Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido, H. and Rodríguez-Garay, B. (1999) Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56 (3): 163-167.
 17. Santos-Valencia, J. C. (2009) Micropropagación de *Agave warelliana* (Baker, 1877). Tesis de licenciatura en Biología. Universidad Veracruzana, México.
 18. Schenk, R. and Hildebrandt, A. (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.
 19. Starsoft, Inc., (2012) Electronic Statistics Textbook. Statsoft, Tulsa, ok, (<http://www.statsoft.com/textbook/>) (Printed version): Hill, T. & Lewicki, P. (2007). Ststistics: Methods and Applications. Statsoft, Tulsa, ok.
 20. Valenzuela-Sánchez, K. K., Juárez-Hernández, R. E., Cruz-Hrenández, A., Olalde-Portugal, V., Valverde, M. y Paredes-López, O. (2006) Plant regeneration of *Agave tequiliana* by indirect organogenesis. *In vitro Cell. Develoment Biology Plant* 42: 336-340.
 21. White, P. (1963) Potentially unlimited growth of excised tomato root tips a liquid medium. *Plant Physiology* 9: 585-600.