

Capítulo 28

Micropropagación de opuntias y agaves

V. M. Villalobos A.*

J. M. Mejía Muñoz**

H. A. Escobar Araya***

-
- * Unidad de Recursos Fitogenéticos, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.
 - ** Laboratorio de Biotecnología, Centro de Genética, Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.
 - *** Instituto de Agronomía, Universidad de Tarapacá, Arica, Chile.

Introducción

La multiplicación intensiva de plantas empleando las técnicas desarrolladas in vitro ha sido una poderosa herramienta en la floricultura del siglo XX. Este éxito ha propiciado el empleo de la micropropagación en hortalizas, frutales y más recientemente, en especies forestales. Los resultados disponibles permiten suponer que la micropropagación sustituirá los sistemas convencionales de multiplicación de muchas especies.

La versatilidad de los sistemas de micropropagación ha favorecido el desarrollo de investigaciones para micropropagar especies de zonas áridas y semiáridas como jojoba (*Simmondsia chinensis*), guayule (*Parthenium argentatum* Gray), mesquite (*Prosopis* spp.), nopal (*Opuntia* spp.) y agaves (*Agave* spp.). Estas especies han sido fuente de productos destinados tanto a la alimentación humana y del ganado como a una diversidad de usos industriales. Una importante característica de estas plantas es su capacidad de establecerse en suelos pobres y con poca agua disponible. La posibilidad de multiplicar masivamente clones de individuos sobresalientes hace muy atractivo el estudio de la micropropagación de estas importantes especies. A continuación se discutirán los logros obtenidos en este laboratorio en la micropropagación de opuntias (nopales) y agaves.

Micropropagación de *Opuntia amyclaea* Tenore

Las opuntias han sido propagadas por semilla o clonalmente mediante la siembra de cladodios o pencas (Escobar, 1985). La propagación por semilla ha sido poco empleada a causa de la amplia segregación en la progenie y del largo período juvenil que muestran los individuos (Escobar et al., en impresión). Por estas razones, la propagación clonal se ha generalizado, empleando los cladodios o fracciones de éstos (García y Grajeda, 1982). Utilizando este último sistema es posible obtener hasta 15 plantas por cada cladodio (Barrientos y Brauer, 1964).

Escobar et al. (en impresión) han considerado que para una eficiente explotación de las especies que crecen en zonas semiáridas, se requiere del establecimiento de sistemas intensivos de producción, donde se aprovechen más eficientemente los limitados recursos de suelo y agua. Sin embargo, es evidente que para implementar estos sistemas se necesita una gran cantidad de clones seleccionados, requisito que limita los métodos tradicionales de propagación referidos anteriormente. En este laboratorio se ha desarrollado un sistema de micropropagación en *Opuntia amyclaea*

Tenore (Escobar, 1985; Escobar et al., 1986) que se discutirá en este capítulo junto con algunos resultados recientes relacionados con el comportamiento de esas plantas en las condiciones del suelo.

Explante y condiciones de cultivo

El material para micropropagar —cladodios de unos 5 cm de largo— fue seleccionado en el campo experimental 'La Nopalera' en Chapingo. Los cladodios fueron desinfectados en el laboratorio después de haberles removido cuidadosamente las espinas. La desinfección se realizó en forma superficial empleando etanol al 70% durante pocos segundos, seguido de una inmersión en hipoclorito de calcio al 6% durante 10 minutos. Después de los enjuagues usuales con agua estéril, el cladodio fue fraccionado en unas 30 pequeñas fracciones que contenían al menos una aréola. Los explantes se cultivaron en el medio básico de Murashige y Skoog (1962) complementado con diferentes concentraciones de benciladenina (BA).

Multiplicación

De los explantes inoculados en el medio, y mantenidos en las condiciones de luz y temperatura normalmente empleadas en la micropropagación de cualquier especie, fue factible regenerar una planta por cada explante después de 40 días de cultivo. Este método permitió rebasar significativamente el sistema tradicional de multiplicación con fracciones de cladodio.

Una modalidad en el sistema *in vitro* permitió incrementar significativamente el número de plantas regeneradas por cada explante. Los 30 brotes desarrollados, en promedio, durante los primeros 25 días de cultivo (antes de inducir la diferenciación radical) se cortaron longitudinalmente, a la vez que se descartó el meristema apical. Estas mitades se incubaron paralelas a la superficie del medio, el cual contenía BA 10 μ M. En los 60 explantes resultantes se desarrollaron las yemas laterales a causa de la eliminación de la dominancia apical por el estímulo del BA sobre el crecimiento de las yemas. En estas condiciones fue posible regenerar un promedio de 15 brotes por cada explante, el cual provenía, a su vez, de una mitad del brote inicial. En suma, se obtuvieron 900 brotes axilares después de 55 días de cultivo. Estos 900 brotes, cortados asépticamente y trasplantados al mismo medio, produjeron un rendimiento de 25,000 brotes después de 85 días de cultivo.

Experimentos llevados a cabo para estimular la rizogénesis demostraron que los brotes forman raíces ya sea espontáneamente o con ayuda de

auxinas. La inducción del sistema radical, en presencia o en ausencia de auxinas, ocurrió 15 días después del trasplante; este resultado demostró la independencia de esta fase respecto a la auxina exógena y permitió, además, pronosticar un promedio de 25,000 plantas después de 100 días de cultivo. La Figura 28.1 resume el proceso de micropropagación de *Opuntia amyklaea* Tenore.

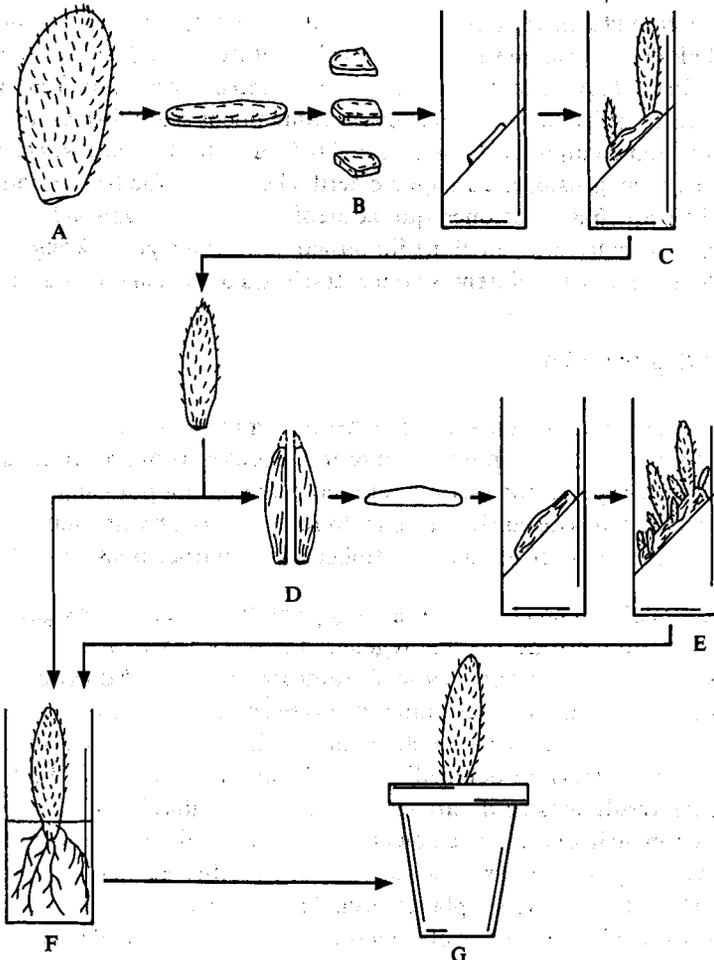


Figura 28.1. Micropropagación de *Opuntia amyklaea* Tenore. A) Cladodio de aproximadamente 5 cm obtenido en el campo. B) Explantes con una o más aréolas. C) Desarrollo de las yemas laterales. D) Corte longitudinal de los brotes eliminando el meristema apical. E) Desarrollo múltiple de las yemas laterales. F) Diferenciación de las raíces en un medio, diluido al 50%, de sales de MS. G) Trasplante al suelo.

Actualmente hay en este laboratorio plantas derivadas de este sistema de multiplicación, que se hallan en condiciones de desarrollarse en suelo. Estos individuos han mostrado diferencias en la velocidad de crecimiento porque experimentaron diferentes tratamientos con auxinas durante la inducción de la raíz; sin embargo, casi todos tienen igual número de cladodios.

Micropropagación de *Agave* spp.

El género *Agave* comprende cerca de 300 especies las cuales, al igual que las del género *Opuntia*, se desarrollan en zonas áridas y semiáridas. Las agaves se han cultivado para la producción de fibras, bebidas alcohólicas, mieles, celulosa y forraje, además de emplearse para el control de la erosión y la conservación de suelos. En lugares con suelos pobres y poca precipitación, las agaves son, frecuentemente, uno de los pocos sustentos económicos de los agricultores de esas regiones.

Las agaves se han propagado clonalmente por bulbillos y por vástagos o rizomas. Cuando se emplea el método de propagación por vástagos, se producen de 6 a 12 plantas anualmente por individuo. El método de propagación por bulbillos es mucho más eficiente, ya que con ellos se pueden producir de 2000 a 3000 plantas de una planta madre adulta, es decir, de aproximadamente 10 años de edad.

El sistema de propagación por vástagos ha probado ser muy ineficiente por el escaso número de plantas regeneradas; no ocurre así, en cambio, con el método alterno. Una de las desventajas de la propagación por bulbillos es el largo tiempo que tarda la multiplicación de clones sobresalientes. Por otro lado, hay una creciente demanda de plantas y se estima, únicamente para 1984, un déficit de 10 millones. Una promisoría alternativa para cubrir esta demanda sería la complementación del sistema de multiplicación por bulbillos con la micropropagación.

En este laboratorio se han ensayado dos métodos de micropropagación de agaves: a) el cultivo de yemas laterales y b) el cultivo de cambium vascular.

Propagación por yemas laterales

Para el estudio de este sistema de micropropagación se emplearon plantas de *Agave atrovirens* de seis meses de edad, las cuales a su vez eran

clones propagados por bulbillos. En el laboratorio se les eliminaron las hojas y raíces dejando un promedio de 10 yemas laterales expuestas en cada planta. Las yemas, junto con una porción del tejido adyacente, fueron aisladas cuidadosamente. En un recipiente limpio se lavaron y desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de calcio al 5% durante 25 minutos; luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril.

El medio de cultivo empleado fue el medio basal de Murashige y Skoog (1962) suplementado con Tiamina-HCl, 1 mg/litro; i-inositol, 100 mg/litro; cisteína, 10 mg/litro; sacarosa, 30 g/litro; y agar, 0.8 g/litro. Con este medio se probaron diferentes concentraciones y combinaciones de ácido indol-3-acético (AIA), benciladenina (BA) y cinetina (KIN). En todos los casos el pH se ajustó a 5.7 antes de la esterilización del medio. Las yemas sembradas fueron incubadas en un cuarto de cultivo con temperatura constante de 27 ± 2 °C y un fotoperíodo de 16 h con una intensidad lumínica de $29 \mu\text{E}/\text{cm}^2$ por sg.

En los medios que contenían KIN (1 mg/litro) más AIA (0.5 mg/litro) observamos que las yemas se desarrollaron rápidamente y alcanzaron 5 cm de largo en 3 semanas de cultivo. Con este proceso fue posible obtener un brote por cada yema incubada. Comparativamente, las yemas cultivadas en el medio que contenía KIN (1 mg/litro) BA (1 mg/litro) y AIA (2 mg/litro) tuvieron un crecimiento lento, pero después de 15 días de cultivo fue evidente el desarrollo de yemas secundarias de tal modo que a los 45 días de cultivo se obtuvo un promedio de 6 brotes, cada uno de cerca de 3 cm de largo, por cada explante.

Cultivo del cambium vascular

En este método las plantas se lavaron con un detergente comercial una vez eliminadas las hojas y la raíz, luego con agua durante 5 minutos, y finalmente se desinfectaron como en el método anterior.

Empleando un sacabocados de 6 mm de diámetro, se aislaron 2 ó 3 cilindros del eje principal de la planta y se los cortó en porciones de 2 mm cada una. Los explantes se cultivaron en el medio MS suplementado con ANA (2 mg/litro) y con kinetina (0.1 mg/litro). En estas condiciones se observó la formación de un callo de color verde en toda la superficie del explante después de dos semanas de cultivo. A la cuarta semana de la siembra estos callos se trasplantaban al mismo medio para estimular su proliferación, o bien se inducían brotes de ellos empleando un medio con KIN (1 mg/litro) más AIA (1 mg/litro). En este último medio la formación

de brotes apareció dos semanas después del trasplante y el día 45 después de éste los brotes tenían un tamaño de 2 cm y estaban listos para inducir el sistema radical. Estos brotes derivados de los callos se pueden multiplicar aún más a razón de 6 brotes por explante, en promedio, empleando el mismo medio usado para la proliferación por yemas laterales.

Enraizamiento

El enraizamiento de los brotes de opuntia y agave no presenta grandes dificultades, y para lograrlo se pueden emplear varios métodos:

- a. Los brotes pueden enraizar simplemente si se trasplantan a un medio de cultivo sin reguladores del crecimiento.
- b. La diferenciación de la raíz puede estimularse rápidamente si los brotes se trasplantan a un medio que contenga 0.5 mg/litro de AIB, diluyendo las sales del medio en un 50%. Se ha observado mejor respuesta al enraizamiento cuando el azúcar se reduce del 3% al 2%; en estas condiciones las primeras raíces se hacen visibles 10 días después del trasplante.
- c. La formación de raíces se estimula in situ, esto es, se trasplantan los brotes a vermiculita y se mantienen en una cámara con alta humedad relativa.

En este último método es importante controlar el ataque de hongos, principalmente.

Establecimiento en el suelo

Una vez enraizados los brotes, se establecen las plantas en el suelo. Debe evitarse que las raíces lleven residuos de agar; para contrarrestar su presencia, la planta debe enjuagarse en soluciones de fungicidas de contacto. Una vez enjuagadas, las plantitas se colocan en bandejas de plástico (o en recipientes similares) y se cubren con bolsas de plástico para mantener una alta humedad relativa. Paulatinamente se reduce la humedad haciendo perforaciones en el plástico, hasta que después de 15 días se descarta el plástico completamente.

Referencias

- Barrientos, P. F. y Brauer, H. O. 1964. Multiplicación vegetativa del nopal a partir de fracciones mínimas de una planta. Serie de investigaciones, no. 1. Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. 4 p.
- Escobar, H. A. 1985. Micropropagación y almacenamiento *in vitro* de *Opuntia amyclaea* Tenore. Tesis. Centro de Fruticultura, Colegio de Posgraduados, Chapingo, México. 80 p.
- ; Villalobos A., V. M. y Villegas M., A. Estudio de las condiciones de enraizamiento, establecimiento y conservación del nopál tunero (*Opuntia amyclaea* Tenore) propagado *in vitro*. Agrocienca. (En impresión.)
- ; ——— y ———. 1986. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 7(3):269-277.
- García, V. M. A. y Grajeda, G. J. E. 1982. Cultivo nopal para verdura. Centro de Genética, Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.