

Influencia del estado físico del medio de cultivo y diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento sobre la formación de brotes axilares en *Agave fourcroydes* Lem.

Miguel Garriga Caraballo, Silvia Alemán García, Gerardo González Oramas*.

Centro de Estudios Biotecnológicos. Universidad de Matanzas Camilo Cienfuegos. Autopista a Varadero km 3 ½. Cuba. *Autor para correspondencia. e-mail: gerardo.gonzalez@umcc.cu

RESUMEN

El henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) es una planta de gran valor económico y ecológico. Las tecnologías empleadas para su micropropagación requieren de una mayor eficiencia, debido a dificultades que se producen principalmente durante la fase de multiplicación. El objetivo del trabajo fue lograr la formación de brotes axilares con una reducción de las concentraciones de reguladores del crecimiento y una disminución en el número de brotes hiperhídricos. Para inducir la formación de brotes axilares de henequén se utilizaron ápices con 35 días de establecidos *in vitro*. A los 45 días se evaluó la influencia del estado físico del medio de cultivo con el empleo de diferentes concentraciones de agar, así como el efecto de diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento (AIB, TDZ y 6-BAP). En el medio de cultivo con 1.0 mg.l⁻¹ de AIB, 1.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP, 0.5 mg.l⁻¹ de TDZ y solidificado con 8.0 g.l⁻¹ de agar se logró con mayor eficiencia la brotación con una mínima aparición de brotes hiperhídricos.

Palabras clave: citoquininas, henequén, hiperhidricidad, organogénesis

ABSTRACT

The henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) is a plant of a great economic and ecological value. The current technologies used for its micropropagation require a bigger efficiency, due to difficulties that take place, mainly during the multiplication phase. The objective of this work was to achieve the formation of axillary shoots with a reduction of the concentrations of growth regulators and a decrease in the number of hyperhydric shoots. Shoot tips of henequen established *in vitro* for 35 days were used to induce the formation of axillary shoots. The influence of different agar concentrations and the use of different combinations of plant growth regulators (IBA, TDZ and 6-BAP) were tested to 45 days. The highest efficient in the axillary shoot multiplication and minimal occurrence of hyperhydricity of the plants during the process were achieved in the culture medium with 1.0 mg.l⁻¹ of IBA, 1.0 mg.l⁻¹ of 6-BAP, 0.5 mg.l⁻¹ of TDZ and hardened with 8.0 g.l⁻¹ of agar.

Key words: cytokinin, henequen, hyperhydricity, organogenesis

INTRODUCCIÓN

El henequén es una especie perenne, de propagación vegetativa, sobre la que existen estudios muy especializados (Casas *et al.*, 1997; Zarate, 1997) lo que ha conllevado a un mejor conocimiento de su origen, variación y tendencias evolutivas en estos últimos años, aunque existe poca divulgación de estos por lo restringido de las zonas de su establecimiento como cultivo de importancia económica.

Esta especie posee gran valor económico y ecológico. Su fibra natural continúa siendo una de las de mayor calidad por su resistencia y longitud, además de ser un cultivo altamente productivo en áreas ecológicas limitadas por escasez de agua y suelo (Colunga *et al.*, 1998). Tiene además, alto potencial de uso como fuente de celulosa a partir de su fibra (Cazaurang *et al.*, 1990) productos naturales como esteroides y detergentes a partir de sus

sapogeninas (Robert *et al.*, 1992) y principios activos para la industria farmacéutica y la industria agropecuaria (Eastmond *et al.*, 2000).

Se han establecidos tecnologías en Cuba para la propagación *in vitro* del henequén (Peña *et al.*, 1997; González *et al.*, 1997), las cuales brindan una vía alternativa para la recuperación henequenera. Sin embargo, estas requieren de una mayor eficiencia, dado el empleo de altas concentraciones de citoquininas en la fase de multiplicación que favorecen la hiperhidricidad y reducen la eficiencia de la fase de enraizamiento, al retardar la formación de raíces con el incremento de los subcultivos. Además de la utilización del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que aunque se emplee en bajas concentraciones, siempre está implícito la probabilidad de la generación de variabilidad (Salisbury y Ross, 1994).

Teniendo en cuenta estos antecedentes se realizó el presente trabajo con el objetivo de lograr la

formación de brotes axilares con una reducción de las concentraciones de reguladores del crecimiento y disminuir el número de brotes hiperhídricos. Para ello se evaluó la influencia del estado físico del medio de cultivo así como el efecto de diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento en la multiplicación *in vitro* de *Agave fourcroydes* Lem.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la inducción de la formación de brotes axilares se utilizaron como explante inicial ápices con 35 días de establecidos *in vitro* obtenidos a partir de plantas *in vitro* de henequén de la línea 4 (Infante, 2003) de 9 meses de cultivo que se encontraban desarrollándose en condiciones de microvivero. Se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con las modificaciones propuestas por Robert *et al.* (1992), con sacarosa (3% p/v) y mio-inositol (100 mg.l⁻¹). Se emplearon frascos de vidrio de 250 ml con 25 ml de medio de cultivo.

La esterilización de los medios de cultivo se realizó en autoclave a una temperatura de 121° C y 1.2 kg.cm⁻² de presión durante 20 min. La solidificación se hizo siempre con Agar Técnico # 3 (BIOCEN). El pH se ajustó a 5.7 con HCl (0.1 N) antes de la esterilización. Los cultivos se incubaron en cámaras de luz solar con una iluminación aproximada de 3 000 lux (37.5 ì mol. m⁻².s⁻¹) y fotoperíodo de 16 horas luz. La temperatura osciló entre los 25 y 28°C.

Influencia de la concentración de agar en el medio de cultivo sobre la proliferación de brotes de henequén

Se utilizaron diferentes concentraciones de Agar (0.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 g.l⁻¹) en el medio de cultivo propuesto por Robert *et al.* (1992) (10 mg.l⁻¹ de 6-bencilaminopurina (6-BAP) + 0.025 mg.l⁻¹ de 2,4-D), en un diseño monofactorial. Se evaluaron a los 45 días las variables: inicio de la formación de brotes axilares (días), número de brotes axilares por explante y número de brotes hiperhídricos. En cada tratamiento se utilizaron 20 plantas distribuidas en cinco réplicas, tamaño muestral propuesto para esta fase por Lima *et al.* (2000).

Los resultados se procesaron estadísticamente a través de un análisis de varianza de clasificación simple, con un diseño completamente aleatorizado. Los datos en porcentajes se transformaron según $X = 2 \arcsin (X/100) 0.5$. Para detectar la diferencia entre las medias se realizó un ANOVA y la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para el 5% de significación, para esto se utilizó el programa STATGRAPHICS versión 2.1 para Windows.

Efecto de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores del crecimiento sobre la formación de brotes axilares de henequén

Para la formación de brotes axilares se probó el efecto de diferentes combinaciones de ácido indol butírico (AIB), 6-BAP y tidiazuron (TDZ), además se utilizó la mejor concentración de agar del ensayo anterior. A los 45 días se evaluaron las siguientes variables: inicio de la formación de brotes axilares (días), número de brotes por explante y número de brotes hiperhídricos. Se emplearon 20 plantas en cada tratamiento distribuidas en cinco réplicas. En un diseño monofactorial. Se empleó en todos los tratamientos la auxina AIB (1.0 mg.l⁻¹) y la citoquinina 6-BAP (1.0 mg.l⁻¹) combinadas con diferentes concentraciones de TDZ (0; 0.25; 0.50 y 0.75 mg.l⁻¹).

Los resultados se procesaron estadísticamente de igual forma que en el ensayo anterior, sin embargo, las medias estadísticas fueron comparadas según la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la Prueba de Rangos Múltiples de Student-Newman-Keuls (SNK). Para estos análisis se empleó el mismo paquete estadístico que en el ensayo anterior.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la concentración de agar en el medio de cultivo sobre la proliferación de brotes de henequén

El inicio de la formación de brotes axilares se favoreció con el incremento de la concentración de agar en el medio de cultivo (Tabla 1). En los tratamientos que emplean las mayores concentraciones de agar (6.0, 8.0 y 10.0 mg.l⁻¹) se produjo la brotación con mayor celeridad lo que evidencia que esta respuesta fue influenciada por la presencia y concentraciones del agar. Según Jiménez (1998) se necesita el uso adecuado de los agentes gelificantes en los medios de cultivo pues ello conducirá a incrementos significativos en la respuesta morfogénica de los explantes.

Con el empleo del medio de cultivo líquido se retardó significativamente el inicio de la nueva brotación. El henequén es una planta xerófita que se desarrolla naturalmente en zonas áridas y semiáridas (Peña *et al.*, 1997) y la presencia de un elevado potencial hídrico en el medio de cultivo indujo una diferenciación más lenta pues es un cultivo adaptado fisiológicamente a condiciones de estrés hídrico. Alvard *et al.* (1993) encontraron que el medio de cultivo líquido empleado para el cultivo de plátano fue el factor limitante del crecimiento pues en este decreció significativamente la

acumulación de masa seca; por otra parte el empleo de medios de cultivo líquido puede provocar asfixia como resultado de la inmersión del explante.

Con el incremento de la concentración de agar el número de brotes se elevó y no se produjeron diferencias estadísticas entre los tratamientos (6.0, 8.0 y 10.0 mg.l⁻¹). Sin embargo, en el medio de cultivo líquido el número de brotes se redujo significativamente, como en otras especies de acuerdo con los resultados obtenidos por Epp (1987) al trabajar con plátano, lo cual ratificó que el henequén es una especie que no responde positivamente al medio de cultivo sin agente gelificante.

La hiperhidricidad como fenómeno indeseable se favoreció en el medio de cultivo líquido y decreció con el incremento de las concentraciones de agar, se obtuvieron los menores porcentajes de explantes hiperhídricos con los tratamientos 8.0 y 10.0 mg.l⁻¹. Los resultados muestran que la solidez del medio de cultivo (determinado por la concentración del agente gelificante) es un factor a tener en cuenta para la propagación de henequén, pues la concentración de este afecta tanto el número de brotes generados por explante como el porcentaje de brotes hiperhídricos, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Castro-Concha *et al.* (1990) en *Agave tequilana* y Rodríguez-Garay *et al.* (1996) en *Agave victoria-reginae* Moore.

Este ensayo sugiere que la multiplicación debe realizarse en un medio de cultivo con la concentración de 8.0 g.l⁻¹ de agar, pues en presencia de 6.0 g.l⁻¹ aunque no se afecta la formación de brotes se duplica el porcentaje de plantas hiperhídricas, lo que puede ocasionar trastornos al proceso de micropropagación, además de que con 10.0 g.l⁻¹ se incrementan los gastos al emplear mayor cantidad de agar.

Influencia de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores del crecimiento sobre la formación de brotes de henequén

En la medida que se incrementó el contenido de TDZ en el medio de cultivo se inició con mayor celeridad la formación de brotes axilares (Tabla 2). Los mejores resultados se alcanzaron con las concentraciones más elevadas de TDZ (0.50 y 0.75 mg.l⁻¹), las cuales se diferenciaron estadísticamente del resto. Estos resultados sugieren que el empleo de TDZ en combinación con 1.0 mg.l⁻¹ de AIB y 1.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP tiene un efecto positivo en el inicio de la nueva brotación en relación con el tratamiento control, el cual se empleó en trabajos anteriores para inducir la brotación axilar (Robert *et al.*, 1992; Peña *et al.*, 1997). Resultados similares fueron obtenidos por Nowack y Miczynski (2002), quienes plantearon que el TDZ tiene una fuerte actividad citoquinina y combinado con AIB favorecieron la organogénesis directa en cultivares de *Prunus domestica*. El tratamiento donde se empleó 1.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP en combinación con 1.0 mg.l⁻¹ de AIB resultó el menos efectivo de todos, lo que indicó la necesidad de mayores concentraciones de citoquininas para favorecer el inicio de la brotación.

En el número de brotes obtenidos no se produjeron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento empleado como control y las combinaciones de reguladores del crecimiento (1.0 mg.l⁻¹ de AIB + 1.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP + 0.5 mg.l⁻¹ de TDZ y 1.0 mg.l⁻¹ de AIB + 1.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP + 0.75 mg.l⁻¹ de TDZ) que emplearon las mayores concentraciones de TDZ. Con este resultado se logró mantener la tasa de multiplicación alcanzada en la tecnología cubana de micropropagación del henequén (Peña *et al.*, 1997), a pesar de que se redujo el contenido de 6-BAP y se eliminó el 2,4-D del medio de cultivo.

Tabla 1. Efecto de la concentración de agar sobre formación *in vitro* de brotes axilares de *Agave fourcroydes* Lem.

Tratamiento (g.l ⁻¹)	Inicio de la brotación (días)	Número de brotes/ explante inicial	Porcentaje de brotes hiperhídricos
0.0	22.36 a	0.58 c	49.78 a
2.0	20.85 b	1.43 b	36.82 b
4.0	20.21 b	1.70 b	30.36 c
6.0	17.21 bc	3.53 a	15.75 c
8.0	17.05 bc	3.55 a	7.31 d
10.0	15.60 c	3.51 a	7.30 d
ES	2.31 *	0.58 *	3.05 *

Los valores de cada tratamiento representan la media de dos experimentos con 20 repeticiones cada uno. Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan. E S: Error Estándar.

Tabla 2. Influencia de las combinaciones y concentraciones de diferentes reguladores del crecimiento sobre la formación *in vitro* de brotes axilares de *Agave fourcroydes* Lem.

Tratamientos (mg.l ⁻¹)	Inicio de la brotación (días)	Número de brotes/ explante inicial	Porcentaje de brotes hiperhídricos
0.025 2,4-D + 10.0 6-BAP	16.40 b	3.43 a	10
1.0 AIB + 1.0 6-BAP	17.90 c	1.95 c	0
1.0 AIB + 1.0 6-BAP + 0.25 TDZ	16.05 b	2.50 b	0
1.0 AIB + 1.0 6-BAP + 0.5 TDZ	15.35 a	3.35 a	0
1.0 AIB + 1.0 6-BAP + 0.75 TDZ	14.95 a	3.45 a	0
H.	20.03 ***	31.83 ***	8.0817 (ns)

Los valores de cada tratamiento representan la media de dos experimentos con 20 repeticiones cada uno. Medias con letras distintas difieren significativamente (H: Estadístico de Kruskal-Wallis para $p < 0.05$).

Las elevadas concentraciones de 6-BAP (10 mg.l⁻¹) que se emplearon en protocolos anteriores para inducir la brotación del henequén (Robert *et al.*, 1992; Peña *et al.*, 1997) en sucesivos subcultivos, traen consigo que se dificulte el proceso de enraizamiento (datos no mostrados), lo que sugiere la existencia de una proporción citoquinina/auxina elevada en la última etapa de la micropropagación y que estas plantas mantienen concentraciones endógenas elevadas de 6-BAP durante algún tiempo posterior a la fase de multiplicación. Azcón-Bieto y Talón (2000) plantearon que la proporción citoquinina/auxina baja favorece el enraizamiento, por ello la disminución del contenido de 6-BAP en el medio de cultivo a 1 mg.l⁻¹ podría favorecer la fase de enraizamiento de las plantas.

La sustitución total del 2,4-D reviste especial importancia para el proceso de micropropagación del henequén, pues este regulador del crecimiento es una fuente potencial de inestabilidad genética (Trigiano, 1999), aún cuando en estudios posteriores González *et al.* (2003) con el empleo del 2,4-D en la inducción de la embriogénesis somática del henequén no registraron variabilidad genética.

El fenómeno de la hiperhidricidad se presentó solo en el tratamiento utilizado como control (Tabla 2), aún cuando no se observaron diferencias estadísticamente significativas con los demás tratamientos evaluados. Este efecto se produjo a pesar de emplear una elevada concentración de agar en el medio de cultivo (8.0 mg.l⁻¹), medida propuesta por Castro-Concha *et al.* (1990) para eliminar o minimizar su aparición. Ello sugiere que las elevadas concentraciones de 6-BAP influyeron en esta respuesta negativa. Aunque este efecto no se esclarece totalmente desde el punto de vista fisiológico si se han informado incrementos en la hiperhidricidad con el aumento de las concentraciones de citoquininas en Pera (Kadeta y Numi, 2003), Manzana (Li Hung *et al.*, 2005) y Castaña (Darcy *et al.*, 2005).

Para inducir la multiplicación en henequén se emplearon varias combinaciones de auxina-citoquinina, pues según Robert *et al.* (1992), el establecimiento de un balance adecuado de reguladores del crecimiento, permitirá un adecuado coeficiente de multiplicación. Sin embargo, Das (1992) logró un aceptado coeficiente de multiplicación solo con citoquinina trabajando en *Agave sisalana*, resultado similar al obtenido por Santacruz-Ruvalcaba (1999) en *Agave parrasana*.

CONCLUSIONES

Se logró mantener el índice de multiplicación de la tecnología cubana de propagación del henequén con 3.35 brotes por explante inicial con el empleo en el medio de cultivo propuesto en el cual se redujo el contenido de 6-BAP y se eliminó el 2,4-D (1.0 mg.l⁻¹ de AIB, 1.0 mg.l⁻¹ de 6-BAP, 0.5 mg.l⁻¹ de TDZ). Se comprobó además, que la concentración de agar de 8.0 mg.l⁻¹ favoreció la multiplicación de los brotes. Con la combinación de 6-BAP y TDZ en bajas concentraciones, se pudo eliminar el efecto de la hiperhidricidad en la multiplicación *in vitro* de henequén.

REFERENCIAS

- Alvard, D, Cote F, Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 55-60
- Casas, A, Pickersgill B, Caballero J, Valiente-Banuet A (1997) Ethnobotany and domestication in Xoconochtili, *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) in the Tehuacan Valley and a Mixteca Baja Mexico. *Economic Botany* 51: 279-292
- Castro-Concha, L, Loyola-Vargas VM, Chan JL, Robert ML (1990) Glutamate deshidrogenasa activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 22: 147-151
- Cazaurang, MN, Peraza SR, Cruz CA (1990) Dissolving-grade pulps from henequen fibers. *Celulose* 24: 629-638
- Colunga, PS (1998) Origen, variación y tendencias evolutivas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). *Bol. Soc. Bot. México* 62: 1-15

- Darcy, L, Fabiola M, Sánchez- Olate M, Escobar R, Pereira G (2005) Variación de la tasa de enraizamiento asociada al número de subcultivo y diámetro de microtallos de castaño. Agricultura Técnica 65 (3): 258-264
- Das, T (1992) Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 31: 253-255
- Eastmond, A, Herrera JL, Robert ML (2000) La biotecnología aplicada al henequén: Alternativas para el futuro. CICY. Mérida
- Epp, MD (1987) Somaclonal variation in Banana. A case study with *Fusarium* wilt. En: Persley, GJ, Delanghe EA (Eds.) Banana and Plantain Breeding Strategies. p.187. ACIAR Proceeding. Camberra
- González, G, Alemán S, Infante D (2003) Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* Lem II: selection among individuals in clonally propagated population. Plant Science 165: 595-601
- González, G, Trujillo R, Darias R, Peña E (1997) Micropropagación del henequén. Aportes a una tecnología. Rev. Jardín Botánico Nacional 17: 177-180
- Infante, D, González G, Peraza L, Keb-Llanes M (2003) Asexual genetic variability in *Agave*. Plant Science 164 (2): 223-230
- Kadeta, M, Numi Y (2003) Effects of citoquinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72 (3) 261-265
- Li Hung, Z, Xue – Yuan, L Welander M (2005) Optimisation of growing conditions for the apple rootstock M 26 grown in RITA container using temporary immersion principle. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 81 (3): 313-318
- Lima, S, González G, Liriano R, Sánchez P (2000) Estudio del tamaño óptimo de la unidad básica del experimento para la determinación de la tecnología de micropropagación del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Centro Agrícola 4: 79-81
- Morales, CF, Lombardi SR, Soares PF, Fortes GR (1999) Efeito do BAP e TDZ na calogenese em internodios de macieira cv. Gala RW1. Rev. Bras. de Agrociencia 5(3): 174-177
- Murashige, T, Skoog, F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plantarum 15: 473-497
- Nowak, B, Miczinski K (2002) The course and efficiency of organogenesis on leaf explants of Plum 'Wegierka Zwycla' (*Prunus domestica* L.) induced by cytokinins. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. <http://www.ejpau.media.pl>. Consulta 12 de enero de 2005
- Peña, E, González G, Berrilo A, Sosa D, Arteaga M, Rittoles D, Pérez D, Torriente Z (1997) Tecnología para la propagación del Henequén a gran escala. Rev. Jardín Botánico Nacional 17-18: 169-176
- Robert, ML, Herrera JL, Chan JL, Contreras F (1992) Micropropagation of *Agave* ssp. Biotechnology in Agriculture and Forestry 19: 306-329
- Rodríguez-Garay, B, Gutiérrez-Mora A, Acosta BA (1996) Somatic embryogenesis of *Agave victoriana-reginae* Moore. Plant cell, Tissue and Organ Culture 4: 85-87
- Salisbury, FB, Ross CW (1994) Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas y giberelinas. Fisiología Vegetal. Iberoamérica. México D.F.
- Santacruz-Rubalcaba, F, Gutiérrez-Pulido H, Rodríguez-Garay B (1999) Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 163-167
- Santamaría, JM (2000) The role of abscisic acid in controlling leaf water loss, survival and growth of micropropagated *Tagetes erecta* plants when transferred directly to the field. Journal of Experimental Botany 51 (352): 1861-1866
- Taiz, L , E Zeiger (1998) Plant Physiology. Sunderland, Massachussetts
- Trigiano, RN, Grey DJ (1999) Plant Tissue culture: Concepts and Laboratory Exercises. CRC Press LLC. Florida
- Zarate, S (1997) Domestication of cultivated Leucaena (*Leguminosae*). Economic Botany 51: 238-250