

## Micropropagación del Henequén: Aportes a una tecnología.

Gerardo González Oramas \*, Reynaldo Trujillo \*\*, Rodolfo Darías \* y Esperanza Peña García \*\*\*

\* Laboratorio de Biotecnología, Universidad de Matanzas; \*\* Centro de Bioplasmas, Ciego de Avila, Cuba; \*\*\* Unidad de Cultivo in vitro, Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana

### RESUMEN

La optimización de una tecnología constituye un aspecto importante para la factibilidad de su aplicación a gran escala. Se realizó un estudio para conocer la posibilidad de reducir en tiempo o eliminar la fase de maduración *in vitro* de los brotes de henequén, unido a su enraizamiento *ex vitro* con vistas a optimizar la tecnología cubana desarrollada recientemente (Peña et al., en prensa). Se demuestra que la incubación de los brotes desarrollados, una vez obtenida su multiplicación, pueden transferirse directamente a sustrato si se incuban durante 24 horas a 22 °C en soluciones de auxina. Se demuestra que el tratamiento con 75 mg/L de AIB proporciona la mejor respuesta. Se discuten los resultados.

### ABSTRACT

Technological improvement is important to analyze factibility for large scale application. Research to know the possibility of reducing time or eliminate maturation phase of henequen shoots, added to *ex vitro* rooting in order to improve the recently developed technology in Cuba was conducted. Shoots incubated during 24 hours at 22 °C in auxin solutions result in the possibility of transferring full developed shoots after multiplication to substrate conditions. A treatment with 75 mg/L gives the best response. Results are discussed.

### INTRODUCCION

La micropropagación de plantas como sistema artificial constituye una poderosa alternativa para la producción de semilla básica que permita satisfacer la demanda de una gran cantidad de cultivos. Los elevados costos de la inversión inicial para la aplicación de este sistema provoca, en muchos casos, la utilización de vías alternativas, aún cuando la calidad del material obtenido sea inferior y los volúmenes necesarios se logren en tiempos mayores. De ahí, que cualquier estudio encaminado a la optimización tecnológica tenga especial interés.

El henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) constituye una planta productora de fibra natural, además del aprovechamiento potencial de un número elevado de subproductos (Peña et al., en prensa). Las condiciones para el cultivo del henequén, de otra parte, no interfieren con las posibilidades de desarrollo de otros cultivos de importancia alimenticia y medicinal, existen áreas donde tradicionalmente se cultivó la planta en Cuba, y en la actualidad, hay creada una infraestructura que permite mantener el desarrollo henequenero.

La técnica de micropropagación ha sido desarrollada para el cultivo masivo del henequén con anterioridad en otros países (Madrigal et al., 1981; Binh et al., 1990; Robert et al., 1987, 1992; Villalobos et al., 1993), y en ellas se refieren diferentes tipos de explanto y su desinfección, medios nutritivos, condiciones de cultivo para las distintas fases *in vitro* y

esquemas de aplicación. Recientemente en Cuba se logró una tecnología ventajosa, capaz de aplicarse a gran escala y utilizando las condiciones existentes en las biofábricas cubanas (Peña et al., en prensa). En esta tecnología, sin embargo, no se evalúa la posibilidad de aclimatizar vitroplantas mediante la supresión de la fase de maduración bajo condiciones de cultivo diferentes a las tradicionalmente aplicadas (Debergh y Maene, 1981; Madrigal et al., 1981; Binh et al., 1990; Robert et al., 1992; Villalobos et al., 1993)

De una parte, se ha establecido la necesidad de una fase de maduración con vistas a desarrollar las ceras epicuticulares y el completo desarrollo del complejo estomático, los cuales determinan una baja supervivencia de los brotes que se aclimatizan (Robert et al., 1992). En la tecnología cubana (Peña et al., en prensa) estas fases se mantuvieron aún cuando las condiciones de cultivo aplicadas incorporan la luz natural a las fases de crecimiento, multiplicación y maduración *in vitro*. Además, si bien es cierto que el enraizamiento *in vitro* que se promueve después de la maduración de los brotes contribuye a la posibilidad de preadaptar las vitroplantas a las condiciones de cultivo en sustrato e incrementa la deposición de ceras epicuticulares (Robert et al., 1992), existe consenso de que las raíces desarrolladas *in vitro* no son funcionales *ex vitro*. En la tecnología cubana (Peña et al., en prensa) pudo eliminarse la fase de enraizamiento *in vitro* con elevada supervi-

veñía pero no así la de maduración.

En el presente trabajo se reportan los resultados de la evaluación de la aclimatización de brotes de henequén, sin la fase de maduración *in vitro* incluida y con el desarrollo *ex vitro* de raíces.

**MATERIALES Y METODOS**

Se utilizaron brotes de henequén crecidos hasta 4 cm, después de sometidos a su multiplicación *in vitro* con las condiciones establecidas antes (Peña et al., en prensa), que incluye la luz natural (fotoperiodo). Una vez separados los pequeños brotes obtenidos, el brote multiplicado se incubó en soluciones de auxina durante 24 horas a 22 °C.

Se aplicaron distintas hormonas y concentraciones de las mismas a tratamientos de 30 brotes. Los tratamientos se presentan en la tabla I.

Tabla I.

Tratamientos aplicados al enraizamiento *ex vitro* de brotes después de la fase de multiplicación. ANA, ácido naftalen-acético; IBA, ácido indol-butírico.

Tratamiento	Hormonas	Concentración
1	0	-
2	ANA	25
3	ANA	75
4	IBA	25
5	IBA	75
6	ANA + IBA	25 + 75
7	ANA + IBA	75 + 75
8	ANA + IBA	25 + 75
9	ANA + IBA	75 + 75

Los brotes se plantaron en una mezcla de sustratos compuesta por residuo vegetal de la caña de azúcar después de la obtención industrial del jugo (cachaza) y arena de mar en proporción 2:1, después de eliminar totalmente el agar de los brotes. Para la preparación del sustrato, la cachaza se dejó fermentar

durante 45 días, se secó y se tamizó. La arena de mar se lavó con agua corriente abundante y se tamizó antes de preparar la mezcla.

Los brotes se aclimatizaron y enraizaron en canteiros de concreto, cubiertos por una malla de tela blanca a fin de lograr un 40% de la luz incidente y reducir la evaporación. Durante los 28 días que abarcó esta fase, los brotes se regaron una vez al día con microjet durante 10'.

Se evaluaron las siguientes características como indicadores de una buena aclimatización:

- . número de hojas producidas
- . altura final de la vitroplanta
- . área foliar de la vitroplanta
- . número de raíces
- . supervivencia

Se aplicó el análisis de varianza y la prueba de Newman Keuls para la evaluación comparativa del efecto de los tratamientos aplicados.

**RESULTADOS Y DISCUSION**

Desde 1981 quedó establecido el protocolo general para la micropropagación de especies vegetales (Debergh y Maene, 1981) que constituye una modificación del establecido anteriormente (Murashige, 1974). En todas las tecnologías desarrolladas se considera la necesidad de su aplicación íntegra teniendo en cuenta que el proceso se realiza bajo condiciones artificiales controladas. Sólo la fase de enraizamiento *in vitro* ha sido cuestionada por la no funcionalidad de las raíces diferenciadas en estas condiciones cuando se cultivan las vitroplantas *ex vitro*.

En henequén, se han desarrollado tecnologías de micropropagación según lo establecido de manera general (Madrigal et al., 1981; Binh et al., 1990; Robert et al., 1987, 1992; Villalobos et al., 1993) y sólo en la tecnología cubana se aplica la luz natural (con fotoperiodo). Sin embargo, no se ha evaluado la repercusión de la luz natural en la optimización de una tecnología, sabiendo que este factor puede tener una influencia grande en el desarrollo de ceras epicuticulares y del complejo estomático.

Los resultados de aclimatizar brotes de henequén provenientes directamente de la fase de multiplicación aparecen en la tabla II.

Tabla II.

Efecto de la aplicación de hormonas para el enraizamiento de brotes de henequén pasada la fase de multiplicación. 1-9, tratamientos hormonales referidos en la Tabla 1; X, valor promedio de los caracteres evaluados; S, grado de significación evaluado para la prueba de Newman Keuls (P O, 05); ES, error estandar; NS, no significativo.

T	No. Hojas		Altura		Area Foliar		No. Raíces		Supervivencia	
	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
1	2,1	-	3,90	bc	3,31	c	2,28	d	12	c
2	2,2	-	3,78	c	3,32	c	4,08	c	18	bc
3	2,1	-	4,34	ab	4,72	ab	5,00	b	22	b
4	2,08	-	4,35	ab	4,25	b	4,86	bc	21	b
5	2,3	-	4,46	a	5,17	a	5,96	ab	25	a
6	2,2	-	4,50	a	4,91	ab	6,31	a	19	b
7	2,1	-	4,38	ab	5,02	ab	7,7	a	27	a
8	2,3	-	4,33	ab	4,66	ab	4,85	bc	21	b
9	2,1	-	4,17	b	4,63	ab	4,15	c	19	b
10	NS	-	1,8		0,9		1,2		3,18	

Se hace evidente la necesidad de aplicar reguladores del crecimiento de naturaleza auxínica para obtener resultados significativamente superiores en la altura de las vitroplantas, área foliar, número de raíces y supervivencia de los brotes que proceden directamente de su multiplicación *in vitro*, y que se aclimatizan durante 28 días. Sólo el número de hojas producidas tiene un comportamiento homogéneo, lo cual no resulta trascendente en este corto lapso de tiempo.

Es importante destacar que los tratamientos que tienen el mayor efecto sobre la supervivencia de los brotes son los que utilizan IBA a una concentración de 75 mg/L (Tratamiento 5) y el que combina ANA e IBA a 75 mg/L de cada una (Tratamiento 7). Estos resultados son similares (90% de supervivencia) a los que se obtienen en la tecnología cubana (Peña et al., en prensa) que incluye la fase de maduración.

Si al resultado de supervivencia se añade el efecto de los tratamientos 5 y 7 en la obtención de los brotes de mayor tamaño, los de mayor número de raíces y de área foliar, es evidente su utilidad potencial. Sin embargo, el efecto del ANA en combinación con el IBA no resulta en un beneficio significativo ni práctico ni económico.

Aspecto a destacar es la composición del sustrato utilizado para la aclimatización. En este caso se introduce

la cachaza como componente orgánico alternativo de sustrato, que en Cuba, es de fácil obtención y permite el desarrollo de la tecnología *in vitro* para la producción masiva de posturas de henequén en áreas donde no exista la infraestructura industrial para el cultivo.

Los resultados obtenidos en este trabajo, además de tener repercusión en la producción anual de vitroplantas por el incremento en el número de ciclos de multiplicación que pueden realizarse anualmente, mucho se relacionan a la aplicación de la luz natural durante las fases de crecimiento y multiplicación *in vitro*, lo cual puede constituir un aporte al futuro desarrollo de la micropropagación. No obstante, para el caso específico del henequén, debe aplicarse la modificación propuesta a mayor escala y evaluar el comportamiento y calidad de las plantas hasta su fase de vivero.

La aclimatización de brotes de henequén después de multiplicados y su enraizamiento *ex vitro* es posible si se aplican las condiciones de cultivo propuestas para las fases *in vitro* en la tecnología cubana unidas a un pretratamiento con 75 mg/L de IBA durante 24 horas a 22 °C con el consecuente incremento en la producción de vitroplantas de calidad capaces de sobrevivir en un porcentaje elevado.

#### BIBLIOGRAFIA

Binh LT, Oanh HTK, Thang TD. 1990. Rapid

propagation of Agave by in vitro tissue culture. Plant Cell Tissue and Organ culture. Vietnam 23: 1.

Debergh PC and Maene LJ. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by Tissue culture. Scient. Hort. 14: 335-345.

Madrigal LR, Doranthes GMR y Rodríguez JL. 1981. Propagación in vitro de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Mem. I Simposio del *Agave*, CORDEMEX, Merida.

Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.

Peña E, González G, Berrillo A, Sosa D, Atreaga M, Rittoles D, Pérez D, Torriente Z. 1996-97. Tecnología para la micropropagación del henequén a gran escala.

Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana. (en prensa).

Robert ML, Herrera JL, Contreras F y Scores KN. 1987. In vitro propagation of *Agave* ssp. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 19.

Robert ML, Herrera JL, Contreras F y Scores KN. 1987. In vitro propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequén), Plant Cell Tissue and Organ Culture 8: 37-48.

Villalobos AVM, Mejías JM y Eşcobar HS. 1993. Micropropagación de *Opuntias* y *Agaves* En: Roca, W.M. y Mroginsky, L.A. (eds.) Cultivo de Tejidos en la Agricultura, CIAT, Cali, Colombia, pp 643-644.

Recibido: 18 de febrero de 1997.