

SALES INORGÁNICAS Y ÁCIDO INDOLBUTÍRICO EN EL ENRAIZADO *in vitro* DE BROTES DE *Agave angustifolia*

INORGANIC SALTS AND INDOLEBUTYRIC ACID ON *in vitro* ROOT INDUCTION IN *Agave angustifolia* SHOOTS

José Raymundo Enríquez del Valle^{1*}, Guillermo
Carrillo Castañeda y José Luis Rodríguez de la O²

¹Laboratorio de Micropropagación, Instituto Tecnológico Agropecuario No. 23. Ex Hacienda de Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán. Apdo. Postal 273, C.P. 68000. Oaxaca, Oax. Tel y Fax 01(951) 517-0788, Correo electrónico: rayenriquez@mejico.com. ²Instituto de Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carr. México- Texcoco. C.P. 56230 Montecillo, Edo. de México. ³Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Fitotecnía, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carr. México-Texcoco. C.P. 56230. Chapingo, Edo. de México.

* Autor para correspondencia

RESUMEN

Brotes adventicios de *Agave angustifolia* se obtuvieron *in vitro* a partir de segmentos de médula de tallo. Para inducir la formación de raíces, los brotes de aproximadamente de 3.5 a 4 cm de longitud, se transfirieron a recipientes de 145 mL que contenían 20 mL de diferentes medios de cultivo constituidos por 1) 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarosa; 2) 50 %, 75 % y 100 % de la concentración de las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962), y 3) 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg L⁻¹ del ácido indolbutírico (AIB). Todos los brotes formaron raíces, aún aquéllos que se establecieron en el medio de cultivo sin AIB. Los brotes establecidos en el medio con las sales a 100 % de concentración y sin AIB, formaron 4.2 raíces en 14 d y 5.8 hojas en promedio. El número de raíces por brote aumentó en relación a la concentración creciente del AIB y la concentración decreciente de las sales inorgánicas en el medio. Los brotes que se desarrollaron en el medio con 75 % de sales y 0.75 mg L⁻¹ de AIB enraizaron en 7 d, y formaron 8.6 raíces y 6.4 hojas, en promedio.

Palabras clave: *Agave angustifolia*, micropropagación, ácido indolbutírico, sales inorgánicas, raíces adventicias.

SUMMARY

Adventitious shoots of *Agave angustifolia* were obtained through the *in vitro* culture of stem tissue. Shoots 3.5 to 4 cm long were transferred to 145 mL, flasks which contained 20 mL of different sterilized media, to induce the root formation. The culture media had: 1) 0.4 mg L⁻¹ of thiamine, 100 mg L⁻¹ of myo-inositol, 30 g L⁻¹ of

sucrose; 2) 50 %, 75 % and 100 % of concentration of the Murashige and Skoog's inorganic salts; and 3) 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 mg L⁻¹ of indolebutyric acid (IBA). All shoots formed roots, including those established in media without IBA. In media without IBA the shoots formed 4.2 roots in 14 d, and 5.8 leaves in the average. The number of roots per shoot was higher as the IBA concentration increased and the salt concentration in the medium decreased. The shoots established in media with 75 % of the MS inorganic salts and 0.75 mg L⁻¹ of IBA, produced 8.6 adventitious roots in 7 d and 6.4 leaves, in the average.

Index words: *Agave angustifolia*, micropropagation, indolebutyric acid, inorganic salts, adventitious roots.

INTRODUCCIÓN

La propagación *in vitro* de *Agave fourcroydes*, *A. sisalana* y *A. victoriae-reginae* ya ha sido documentada (Groenewald *et al.*, 1977; Robert *et al.*, 1987; Madrigal Lugo *et al.*, 1990; Das, 1992; Rodríguez- Garay *et al.*, 1996). *A. angustifolia* se cultiva en el estado de Oaxaca en más de 15 mil hectáreas con 1 500 plantas/ha en promedio. Los agricultores propagan asexualmente las plantas mediante hijuelos de rizoma y bulbilos de inflorescencia y, desde el año 1985 se trabaja para desarrollar una metodología de propagación clonal *in vitro* de *A. angustifolia*, que complemente a los métodos convencionales.

En los periodos 1987-1988, y de noviembre del 2001 a diciembre del 2003, se generaron *in vitro* y transfirieron a invernadero para su adaptación 10 000 y 42 000 plantas, de las cuales 8 000 (Enríquez y Díaz, 1994) y 40 000 plantas se adaptaron y establecieron en vivero, respectivamente. Las plantas del primer periodo permanecieron un año en vivero, donde mostraron crecimiento similar a plantas generadas mediante métodos convencionales; posteriormente se cultivaron en campo y cosecharon siete años después. Las plantas generadas durante el segundo periodo están en plantación definitiva.

La propagación *in vitro* de la especie citada hasta su establecimiento en plantación, permite hacer modificaciones continuas al método en sus diferentes etapas, para incrementar la eficiencia de éste y la calidad de las plantas. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la concentración del ácido indolbutírico (AIB) y de las sales inorgánicas, sobre la formación de raíces adventicias en brotes de *A. angustifolia*. Al respecto se postuló la hipótesis de que la concentración de sales minerales influye en la magnitud del efecto del (AIB) para inducir la formación de raíces adventicias en los brotes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Brotes adventicios de 1 a 3 cm de longitud de *A. angustifolia* se obtuvieron *in vitro* mediante organogénesis

directa, de tejidos de médula de tallo de 1 cm de diámetro y 3 mm de grosor, en el medio básico con las sales inorgánicas de Murashige y Skoog, MS (1962), suplementado con 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de mio-inositol, 30 g L⁻¹ de sacarosa, y 1.0 mg L⁻¹ de benciladenina (BA). Los cultivos se incubaron bajo luz blanca fluorescente a 2,000 lux de intensidad, en fotoperiodo de 16 h y 8 h de oscuridad, y de 22 a 28 °C de temperatura.

Para la multiplicación de propágulos, los brotes que se formaron en cada explante se subcultivaron cada ocho semanas en frascos de vidrio de 145 mL que contenían 20 mL del medio de cultivo antes indicado, y se mantuvieron bajo las condiciones de incubación descritas. Cuando se obtuvieron suficientes brotes de 3.5 a 4 cm de longitud, éstos se separaron individualmente y se establecieron cuatro brotes en cada frasco de 145 mL con 20 mL de medio de cultivo, para inducción de raíces.

Los 15 tratamientos en que se establecieron los brotes, estuvieron constituidos por el medio básico donde se varió la concentración de las sales inorgánicas MS (50, 75 y 100 %), y del ácido indolbutírico (AIB) (0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg L⁻¹). Los cultivos se incubaron durante 21 d, bajo las condiciones de iluminación y temperatura ya descritas. Se registró el porcentaje de brotes que formaron raíces, días que tardaron en emerger las raíces, cantidad de raíces que se formaron en el brote y número de hojas. La unidad experimental fue un brote y tuvieron 15 repeticiones por tratamiento. El análisis de varianza de los datos se efectuó bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, donde el factor concentración de las sales inorgánicas tuvo tres niveles y el factor concentración del AIB tuvo cinco niveles. Para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando los propágulos son preparados para su trasplante a suelo y que corresponde con la etapa III de enraizado de los brotes, éstos se podrían establecer en un medio con menor concentración de sales inorgánicas (Murashige, 1974; Pierik, 1987). Los brotes de *A. angustifolia* formaron raíces en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) con las sales inorgánicas a 50 % de concentración y sin fitohormonas. Al incorporar ácido indolacético (AIA) o ácido indolbutírico (AIB) en el medio, los brotes formaron raíces en mayor cantidad, conforme aumentó la concentración de la auxina hasta 1.0 mg L⁻¹ (Enríquez y Díaz, 1994), pero no se estudió el comportamiento de la parte aérea bajo el efecto del medio para enraizado.

Los brotes generados *in vitro* de diversas especies son inducidos a formar raíces adventicias en medios de cultivo adicionados con auxinas, cuya concentración afecta la cantidad de raíces, su longitud y sus ramificaciones (McCown, 1986), pero poco se conoce sobre el papel de otros factores en el ambiente de enraizado que influyen en el efecto de las auxinas. En el presente trabajo, la concentración de las sales inorgánicas en el medio de cultivo, tuvo una relación positiva con el número de días en que las raíces emergieron de los brotes y una negativa con la cantidad y longitud de las raíces, y la formación de hojas.

La propagación *in vitro* de plantas se desarrolla por etapas debido a que interesa controlar las respuestas organogénicas, por lo que importa establecer los medios de cultivo como el tipo, combinación y las proporciones de las fitohormonas a utilizar. Para la proliferación de brotes, los propágulos se establecen en medios de cultivo con mayor proporción de citocininas y, posteriormente, para que los brotes formen raíces se transfieren a medios de cultivo sin fitohormonas o con auxinas. La concentración de sales inorgánicas en el medio afecta la magnitud de la expresión organogénica, ya que en callos de *Catharanthus roseus* se incrementó la formación de brotes cuando se cultivaron en medios con menor concentración de sales inorgánicas (Morard y Henry, 1998). En papa (*Solanum tuberosum*) se obtuvieron plantas con mayor área foliar cuando se desarrollaron en medios con menor concentración de nitrógeno (Tadesse *et al.*, 2000). Así también, brotes de *Populus tremula* formaron 16 y 3 raíces adventicias en promedio al establecerlos en los medios de cultivo WPM y el de Murashige y Skoog (1962) respectivamente, ambos sin auxinas, pero el primer medio tenía 44 % de la concentración total de sales inorgánicas en comparación con el segundo (McCown, 1986).

Todos los brotes de *A. angustifolia* formaron raíces, aun los que se establecieron en medios sin fitohormonas. Sin embargo, a los 21 d después de establecer los cultivos se detectó que las concentraciones de las sales MS entre 50 y 100 % tuvieron efectos significativos ($P \leq 0.01$) sobre la cantidad y longitud de las raíces, así como en la cantidad y tamaño de las hojas (Cuadro 1). Cuando los brotes se establecieron en el medio de cultivo para inducir la formación de raíces, éstos tenían cuatro hojas.

Cuadro 1. Cuadrados medios y estadísticos descriptivos del enraizamiento in vitro de brotes de *A. angustifolia* desarrollados bajo diferentes concentraciones de sales inorgánicas y ácido indolbutírico (AIB).

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios				
		Días a emergencia de raíces	Núm. de hojas	Long. de hojas (cm)	Núm. de raíces	Lóng. de raíz (cm)
Tratamiento	14	61.8	7.51*	8.0*	53.3**	12.7**
Concent. sales	2	0.5 ns	12.3**	25.2**	52.8*	25.5**
Concent. AIB	4	42.1 **	4.7**	12.4**	134.5**	6.2**
Sales x AIB	8	86.9 **	7.8 ns	1.5 ns	12.8 ns	12.8**
Error	210		4.0	4.5	11.9	4.2
	187 ⁺	26.9				
Total	224					
	201 ⁺					

*= valor de F_0 significativo ($P \leq 0.05$). **= valor de F_0 altamente significativo ($P \leq 0.01$). ns = no significativo ($P \leq 0.05$). ⁺ = grados de libertad para el error y total, en la variable tiempo para que emergieran las raíces.

Cuadro 2. Formación de raíces y crecimiento de brotes de *Agave angustifolia* que se cultivaron durante 21 días en medios de cultivo con diferentes concentraciones de las sales inorgánicas MS (1962) y ácido indolbutírico (AIB).

Núm.	Tratamiento		Núm. de Hojas	Longitud de hoja (cm)	Núm. de raíces	Longitud de raíz (cm)
	Conc. sales (%)	Conc. AIB (mg L ⁻¹)				
1	100	0	5.8 ab	7.8 ab	4.3 e	6.3 abc
2	100	0.25	5.4 ab	7.6 ab	4.9 de	5.9 abc
3	100	0.50	7.2 ab	8.2 ab	6.3 bcd	7.6 a
4	100	0.75	6.2 ab	8.2 ab	7.5 ab	7.2 ab
5	100	1.00	6.2 ab	8.5 a	7.2 abc	5.3 abc
6	75	0	6.6 ab	6.5 ab	4.5 e	4.6 c
7	75	0.25	5.4 b	5.8 b	7.6 ab	5.1 abc
8	75	0.50	6.0 ab	7.6 ab	5.7 cde	4.6 c
9	75	0.75	6.4 ab	7.1 ab	8.6 a	5.8 abc
10	75	1.00	6.8 ab	7.0 ab	7.2 abc	6.1 abc
11	50	0	6.2 ab	6.4 ab	4.7 e	4.9 bc
12	50	0.25	7.4 ab	7.0 ab	7.1 abc	6.9 abc
13	50	0.50	6.9 ab	7.0 ab	6.9 bc	4.9 bc
14	50	0.75	7.8 a	7.5 ab	4.4 e	6.4 abc
15	50	1.00	6.1 ab	7.8 ab	8.5 a	5.8 abc

Promedios con la misma letra, son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05)

El AIB redujo significativamente el tiempo en que emergieron las raíces, pues en los medios sin la auxina las raíces adventicias emergieron de los brotes en 14.6 d en promedio, mientras que en los brotes cultivados en presencia de AIB, las raíces emergieron en 47 % menos tiempo. El AIB estimuló que se formaran más raíces adventicias, hasta 6.8 y 7.6 raíces en promedio en los brotes sometidos a los tratamientos con 0.75 y 1.0 mg L⁻¹ de AIB, cantidades que superan en 54 % y 72 % ($P \leq 0.05$) a las 4.4 raíces adventicias que formaron los brotes en los medios sin auxina. La presencia de AIB también estimuló la formación de más de hojas en la planta (Cuadros 1 y 2). La cantidad de raíces adventicias que se formaron en los brotes tuvo relación inversa con la concentración de sales en el medio. Los brotes cultivados en los medios con 75 y 50 % de las sales MS formaron 7.1 raíces en promedio, cantidad 18 % superior ($P \leq 0.05$) a la cantidad de raíces que tuvieron los brotes en el medio con las sales a 100 % de concentración.

Al micropropagar *A. sisalana* a partir de fragmentos de rizoma, la adición de benciladenina al medio de cultivo estimuló la regeneración de brotes adventicios, pero tal regeneración fue más eficiente cuando el medio contenía las sales minerales de Schenk y Hildebrandt (1972) (SH), en comparación con las sales del MS (Tapati, 1992); la suma de aniones y cationes de la formulación SH es de 64 meq L⁻¹, 36 % menor a la del MS. En *A. victoriae-reginae*, los fragmentos de tallo que se establecieron en medios que contenían los macronutrientes MS a 50 % de concentración (49.6 meq L⁻¹) formaron más brotes que los fragmentos de tallo que se establecieron en medios con los iones de macronutrientes en la concentración original (99.2 meq L⁻¹) (Martínez-Palacios *et al.*, 2003). En los trabajos citados la concentración de sales minerales influyó en la cantidad de brotes adventicios que se formaron en respuesta del estímulo de las citocininas en el medio de cultivo, pero sin mencionar interacciones, mientras que en el presente trabajo se demuestra que durante la formación

de raíces adventicias en los brotes hubo interacción significativa ($P \leq 0.01$) (Cuadro 1) entre las concentraciones de sales minerales y los de AIB.

Los resultados anteriores pueden indicar que la concentración mineral en el medio de cultivo afectó la sensibilidad de las células para responder al estímulo organogénico inducido por el AIB. La sensibilidad es “la capacidad de un tejido para responder a un estímulo”, ya que las membranas celulares poseen proteínas “receptoras” que son sitios de reconocimiento de estímulos y el aumento o disminución en sensibilidad es causado por mayor o menor cantidad de estos receptores, según la condición fisiológica de las células (Venis, 1987; Timpte, 2001). Diversas condiciones como niveles de iones, flujo de iones, potenciales eléctricos y presión, alteran la estructura de la membrana y la cantidad de receptores (Trewavas, 1987).

Un litro de medio de cultivo con las sales MS a 100 % de concentración tiene un costo de \$ 21.25, donde las sales minerales representan 7.87 % de estos costos. Al disminuir a 75 % y 50 % la concentración de sales minerales, el costo del medio bajaría en 1.07 % y 3.95 %, respectivamente, sin afectar negativamente la calidad de las plantas y su capacidad para adaptarse al transferirlas a sustratos y condiciones de invernadero.

Se concluye entonces que la adición de AIB hasta 1.0 mg L⁻¹ al medio de cultivo, estimula el crecimiento de los brotes de *A. angustifolia* y la formación de mayor cantidad de raíces en menos tiempo, en comparación con brotes cultivados en medios sin AIB. Los brotes formaron más raíces adventicias y más largas conforme se disminuyó de 100 a 50 % la concentración de las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962). Los brotes cultivados en el medio con las sales inorgánicas a 75 % de concentración y 0.75 mg L⁻¹ de AIB formaron 8.6 raíces adventicias, el doble de la cantidad de raíces que formaron los brotes cultivados en el medio con las sales inorgánicas a 100 % y sin AIB.

BIBLIOGRAFÍA

- Das T (1992) Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 31:253-255.
- Enríquez V J R, B Díaz R (1994) Experiencias sobre propagación *in vitro* de plantas. Instituto Tecnológico Agropecuario de Oaxaca. Serie Cuadernos de los Centros No. 1. 37 p.
- Groenewald E G, D C J Wessels, A Koeleman (1977) Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (*Agavaceae*). Z. Pflanzenphysiol. 81:369-373.
- Madrigal-Lugo R, F Pineda E, J L Rodríguez de la O (1990) *Agave*. In: Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 5. Ornamental Species. P V Amirato, D A Evans, W R Sharp, Y P S Bajaj (eds). McGraw-Hill. New York, USA. pp:206-227.
- Martínez-Palacios A, M P Ortega-Larrocea, V M Chavez, R Bye (2003) Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: considerations for its conservation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46:85-87.
- McCown B H (1986) Adventitious rooting of tissue culture plants. In: Adventitious Root Formation In Cuttings. T M Davis, B E Haisig, N Sankhla (eds). Dioscorides Press. Portland, Oregon. pp:289-302.
- Morard P, M Henry (1998) Optimization of the mineral composition of *in vitro* culture media. J. Plant Nutr. 21: 565-576.
- Murashige T, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Murashige T (1974) Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-166.
- Pierik R L M (1987) *In Vitro* Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 344 p.
- Robert M L, J L Herrera, F Contreras, K N Scorer (1987) *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 8:37-48.
- Rodríguez-Garay B, A Gutiérrez-Mora, B Acosta-Dueñas (1996) Somatic embryogenesis of *Agave victoriae-reginae* Moore. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46:85-87.
- Schenk R U, A C Hildebrandt (1972) Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50:199-204.
- Tadesse M, W J M Lommen, P C Struik (2000) Effects of *in vitro* treatments on leaf area growth of potato transplants during acclimatization. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 61:59-67.
- Tapati D (1992) Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 31:253-255.
- Timpte C (2001) Auxin binding protein: coriouser and coriouser. Trends Plant Sci. 6:586-590.
- Trewavas A J (1987) Sensitivity and sensory adaptation in growth substance responses. In: Hormone Action in Plant Development, A Critical Appraisal. G V Hoad, J R Lenton, M B, Jackson, R K Atkin (eds). Butterworths. London. pp:19-38.
- Venis M A (1987) Hormone receptor sites and the study of plant development. In: Hormone Action in Plant Development, A Critical Appraisal. G V Hoad, J R Lenton, M B, Jackson, R K Atkin (eds). Butterworths. London. pp:19-38.