

Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker

Micropropagation protocol for *Furcraea macrophylla* Baker

María A. Martínez¹ y José C. Pacheco²

Resumen: Del género *Furcraea* hacen parte especies textiles de gran importancia en los mercados nacionales e internacionales, tanto por las características de la fibra como por el contenido de precursores de hormonas, corticoides, azúcares, ácidos grasos y biopesticidas que se encuentran en sus jugos. En esta investigación se desarrolló un protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* B. a partir de ápices caulinares procedentes de bulbillos. Los cultivos *in vitro* se realizaron en medio MS modificado y suplementado con BA, TDZ, KIN y 2-IP en forma individual o en combinación con 2,69 μM de ANA. Después de 12 semanas de iniciados los cultivos, en la mayoría de los tratamientos ensayados los explantes desarrollaron brotes axilares. 100% de los brotes producidos enraizaron después de 30 d en medio MS modificado suplementado con 11,42 μM de AIA, con 2,46 μM de AIB o en ausencia de reguladores de crecimiento. Después de la etapa de endurecimiento, 94% de las plántulas sobrevivieron en condiciones *ex vitro*. El protocolo establecido para la micropropagación de *F. macrophylla* es un procedimiento efectivo con el que se podría suplir la demanda comercial de material vegetal seleccionado, en óptimo estado fitosanitario, en periodos relativamente cortos y a bajos costos.

Palabras clave adicionales: Agavaceae, brotes axilares, reguladores de crecimiento, fique

Abstract: To the genus *Furcraea* belong textile species of great importance for the national and international markets, so much for the characteristics of their fiber as for the content of precursors of hormones, corticoides, sugars, fatty acids, biopesticides, and many other products in their juices. In this research, a protocol was developed for micropropagation of *Furcraea macrophylla* B., starting from shoots apex from bulbils. The *in vitro* cultures were carried out in modified MS and supplemented with BA, TDZ, KIN and 2-IP alone or in combination with 2.69 μM NAA. After 12 weeks of initiation the cultures, in most of the achieved treatments, the explants developed axillary shoots. One hundred percent produced shoots rooted after 30 days in modified MS medium supplemented with 11.42 μM IAA, or with 2.46 μM IBA, or without growth regulators. After the hardening stage, 94% of the plantlets survived under *ex vitro* conditions. The established protocol for micropropagation of *F. macrophylla* is an effective procedure to supply the commercial demand of selected plant material, with good phytosanitary conditions, in relatively short periods and at low cost.

Additional key words: Agavaceae, axillary shoots, growth regulators, furcraea

Introducción

LA FAMILIA AGAVACEA COMPRENDE 18 géneros y 600 especies propias de zonas tropicales y subtropicales, perfectamente adaptadas para sobrevivir en condiciones

semidesérticas. Varias de estas especies son de interés económico por su valor ornamental o por ser fuente de productos de interés (Devesa, 1997). Los géneros *Agave* y *Furcraea* son los más representativos de la familia Agavaceae. Los ágaves comprenden plantas textiles, como el

Fecha de recepción: 04 de mayo de 2006

Aceptado para publicación: 30 de noviembre de 2006

¹ Bióloga, Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Tunja. e-mail: maramca79@yahoo.com

² Profesor titular, Escuela de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Tunja. e-mail: jopach@hotmail.com

sisal (*A. sisalana*) y el henequén (*A. fourcroydes*); ornamentales (*A. victoria-reginae*) y para producción de bebidas (*A. tequilana*). Las furcraeas comprenden plantas textiles, como borde de oro (*F. castilla*), uña de águila (*F. macrophylla*) y cenizo (*F. cabuya*), entre otras.

En Colombia se conoce con el nombre de fique a las plantas que pertenecen al género *Furcraea*, que comprende aproximadamente 20 especies, algunas de ellas utilizadas para extraer de sus hojas la fibra textil conocida como cabuya. De la planta sólo se aprovecha 4% de la hoja, que corresponde a la fibra; el 96% restante son jugos y fibras cortas. Este bajo porcentaje de aprovechamiento de las plantas hace que los cultivos no sean rentables, razón por la que las plantaciones fueron abandonadas y/o erradicadas en décadas anteriores. Sin embargo, las investigaciones realizadas en los últimos años han creado nuevas expectativas para el aprovechamiento integral de la planta. En su jugo se han encontrado, entre otros compuestos, precursores de productos hormonales, corticoides, ácidos grasos, azúcares, sulfatos y sustancias con actividad biopesticida (MAVDT *et al.*, 2002). Además, tanto la fibra larga como la fibra corta son materia prima para la industria y la artesanía. Pero, a pesar de estas expectativas, el aprovechamiento integral del fique a gran escala enfrenta la falta de genotipos seleccionados y de material vegetativo suficiente para la renovación y establecimiento de nuevas plantaciones.

El fique es una planta monocotiledónea, de crecimiento lento, con un ciclo de vida largo (aproximadamente, 20 años), florece sólo una vez hacia el final de su ciclo de vida y raramente produce semillas fértiles. Por tanto, el mejoramiento y la propagación sexual presentan serias dificultades. La propagación ocurre principalmente a través de bulbillos, que son yemas epigeas o axilares de la inflorescencia que se producen en el maguey (flor), y a través de hijuelos que crecen en el tronco de la planta.

Para la propagación *in vitro* de agaváceas, se han aplicado diferentes técnicas de cultivo, utilizando segmentos caulinares y foliares, bulbillos, semillas, callos, meristemos, yemas, embriones zigóticos (tabla 1). La mayoría de estas técnicas se ha enfocado a la multiplicación masiva a través de brotes adventicios y/o axilares y la producción de embriones somáticos. Se ha

reportado: organogénesis directa e indirecta para diversas especies, como *A. arizonica* (Powers y Backhaus, 1989) y *A. fourcroydes* (Muñoz *et al.*, 2004; Eastmond *et al.*, 2000; Madrigal *et al.*, 1989; Robert *et al.*, 1987), *A. sisalana* (Binh *et al.*, 1990), *Agave sp.* (Groenewald *et al.*, 1977) y *A. tequilana* (Castro *et al.*, 1990); proliferación de brotes directamente del explante original, para *A. fourcroydes* (Robert *et al.*, 1987), *A. sisalana* (Das, 1992) y *A. schidigera* (Rodríguez *et al.*, 1996a); proliferación de brotes adventicios a partir de callos, en *A. sisalana* (Hazza *et al.*, 2002; Nikam, 1997) y *A. cocui* (Yépez *et al.*, 2004); proliferación por brotes axilares en *A. parrasana* (Santacruz *et al.*, 1999); embriogénesis somática en especies ornamentales, como *A. victoria-reginae* (Martínez *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 1996b) y especies textiles, como *A. sisalana* (Nikam *et al.*, 2003) y *A. fourcroydes* (González *et al.*, 2001).

En especies del género *Furcraea* no se han encontrado reportes sobre manipulación *in vitro* de tejidos. En esta investigación se desarrolló un protocolo para micropropagación de *F. macrophylla* B. a través de brotes axilares, utilizando como explantes primarios ápices caulinares extraídos de bulbillos procedentes de plantas seleccionadas.

Materiales y métodos³

Material vegetal

Se seleccionaron plantas madre de 15-20 años, con hojas productivas de 3 m, inflorescencia vigorosa con una producción de hasta 3.000 bulbillos. Los bulbillos utilizados como fuente de explantes primarios se seleccionaron teniendo en cuenta un tamaño uniforme, de 10 a 12 cm de longitud y 3 cm de diámetro basal.

A los bulbillos seleccionados se les eliminaron las hojas de color verde, conservando la pequeña porción caular para facilitar la manipulación; la desinfección superficial se realizó en cámara de flujo laminar, así: inmersión en agua destilada estéril más Tween 20 (0,5 mL por 100 mL) durante 10 min, con agitación continua; inmersión en alcohol al 70% durante 1 min y en hipoclorito de Ca ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$, 5-10%) durante 25 min; finalmente se enjuagaron 4 veces consecutivas, 3 min cada una, con agua destilada estéril. La escisión de los ápices caulinares se realizó con ayuda de bisturí

³ Abreviaturas: BA, 6-bencilaminopurina; KIN, 6-furfuril-aminopurina; TDZ, N-fenil N'-1,2,3-tidiazol-5-il úrea; 2-IP, 2-isopentenil adenina; ANA, ácido naftalenacético; AIA, ácido 3-indol-acético; AIB, ácido 3-indol-butírico y MS, medio de Murashige y Skoog (1962).

Tabla 1. Algunos estudios *in vitro* realizados en agaváceas.

Especie	Tipo de explante	Medio y/o reguladores de crecimiento	Resultados	Referencia
Agave sp.	Segmentos de tallo de bulbillos	Inducción: $1S + 14,76 \mu M$ IBA Proliferación: $1S + 1,71 \mu M$ AIA + $4,65 \mu M$ KIN	Callo, brotes adventicios	Madrigal et al., 1989
A. arizonica	Segmentos basales de hojas in vitro	Inducción: $1S + 0,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D Regeneración: $MS + \text{piridoxina-HCl } 0,5 \mu M + \text{tirosina } 100 \text{ mg/L} + BA$ $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + ANA$ $0,09-1,0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{adenina } 80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Callos, regeneración de brotes	Powers y Backhaus, 1989
A. sisalana	Segmentos de tallo de brotes in vitro	$MS + 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sacarosa, 10% agua de coco, $0,075 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ANA, $0,49 \mu M$ IBA y $2,32 \mu M$ KIN	Múltiples brotes, callo, plántulas enraizadas	Binh et al., 1990
A. sisalana	Segmentos de tallo, bulbillos y rizomas	$MS; SH; \text{Gamborg y White} + AIA; ANA; 2,4-D, KIN$ y BA ($0,44$ a $28,54 \mu M$)	Callos, múltiples brotes y regeneración de plántulas	Nikam, 1997
A. sisalana	Segmentos de hojas in vitro	$MS + 1.000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CH + BA ($8,9-44,0 \mu M$) Transferencia a $MS \frac{1}{2} + BA$ $8,9 \mu M$	Callos, proliferación brotes adventicios	Hazra, 2002
A. sisalana	Brotes in vitro	$MS + 4,65-9,29 \mu M$ KIN ó $0,88-2,22 \mu M$ BA + $0,90-2,26 \mu M$ 2,4-D	Embriogénesis somática	Nikam et al., 2003
A. parrasana	Semilla	$MS + \text{vitaminas } 12 + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sacarosa, 2,4-D ($0,0$ a $0,04 \mu M$) + BA ($26,6; 39,9$ y $53,2 \mu M$)	Proliferación brotes axilares	Santacruz et al., 1999
A. victoria-reginae	Segmentos de hojas in vitro	$MS + \text{vitaminas } 12 + 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sacarosa + 2,4-D $1,4 \mu M$	Embriogénesis somática indirecta	Rodríguez et al., 1996
A. victoria-reginae	Segmentos de tallo de plántulas	$MS + 2,26 \mu M$ 2,4-D	Callos embriogénicos, embriogénesis somática	Martínez et al., 2003
A. cocui	Segmentos de hojas in vitro	Inducción callo organogénico: $MS + 4,52 \mu M$ 2,4-D + $4,44 \mu M$ BA Organogénesis: BA $44,38 \mu M$	Callos, organogénesis indirecta	Yépez et al., 2004
A. fourcroydes	Yemas apicales de bulbillos	Knudson y $MS + 13,31 \mu M$ BA KM + $0,46 \mu M$ KIN + $32,22 \mu M$ ANA	Proliferación brotes axilares, callos organogénicos	Muñoz et al., 2004
A. fourcroydes	Meristemos apicales de plantas seleccionadas	Inducción de callo, MS modificado + $0,011 \mu M$ 2,4-D + $4,44 \mu M$ de BA Embriogénesis: 2,4-D ($12,65; 25,5; 102,24 \mu M$) + $2,32 \mu M$ KIN	Embriogénesis somática	González et al., 2001

BA, 6-bencilaminopurina; KIN, 6-furfuril-aminopurina; TDZ, N-fenil N'-1,2,3-tidiazol-5-il úrea; 2-IP, 2-isopentenil adenina; ANA, ácido naltalenacético; AIA, ácido 3-indol-acético; AIB, ácido 3-indol-butírico y MS, medio de Murashige y Skoog (1962).

y estereoscopio, eliminando progresivamente las hojas en desarrollo. Los ápices caulinares escindidos, con un tamaño de 0,7 a 1,0 cm (figura 1a), comprenden el meristemo, los primordios foliares y las primeras hojas en desarrollo.

Inducción y proliferación de brotes axilares

Para inducir la formación de yemas y promover el desarrollo de brotes axilares, los ápices caulinares se cultivaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con macroelementos y Fe-EDTA disminuidos a la mitad de la concentración original, suplementado con BA ($13,31$ ó $22,19 \mu M$), 2-IP ($24,61$ ó $34,4 \mu M$), KIN ($32,52$ ó $46,47 \mu M$) ó TDZ ($0,045$, $0,225$ ó $0,45 \mu M$) en combinación con $2,69 \mu M$ de ANA. Los explantes se mantuvieron en los mismos medios durante 180 d, transfiriéndolos a medio fresco cada 45 d. Para el establecimiento de cadenas proliferativas, después de la tercera transferencia, los brotes de longitud $\geq 1,5$ cm se individualizaron y subcultivaron en los mismos medios utilizados durante la etapa de inducción. Esta última etapa se repitió cada 60 d.

Enraizamiento de brotes axilares

Para estimular la formación de raíces, se cultivaron brotes de longitud ≥ 3 cm durante 4 semanas en el mismo medio utilizado para inducción y proliferación de brotes, al que se le adicionó $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sacarosa y se suplementó o no con $11,42 \mu M$ de AIA ó $2,46 \mu M$ de AIB.

Condiciones generales de cultivo

A todos los medios utilizados se les ajustó el pH a 5,7 con HCl ($0,1 \text{ N}$) ó KOH ($0,1 \text{ N}$), se solidificaron con $7,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de agar y se esterizaron en autoclave a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y $1 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ de presión durante 20 min. Los explantes se cultivaron en recipientes de vidrio de 5 y 50 mL con alícuotas de 3 y 25 mL de medio para las etapas de inducción y multiplicación, respectivamente. Los cultivos se incubaron a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y con fotoperíodo de 16 h suministrado por lámparas Silvana de 75 w.

Aclimatización

Los brotes enraizados se extrajeron de los recipientes de cultivo, se les eliminó el agar adherido a las raíces y se

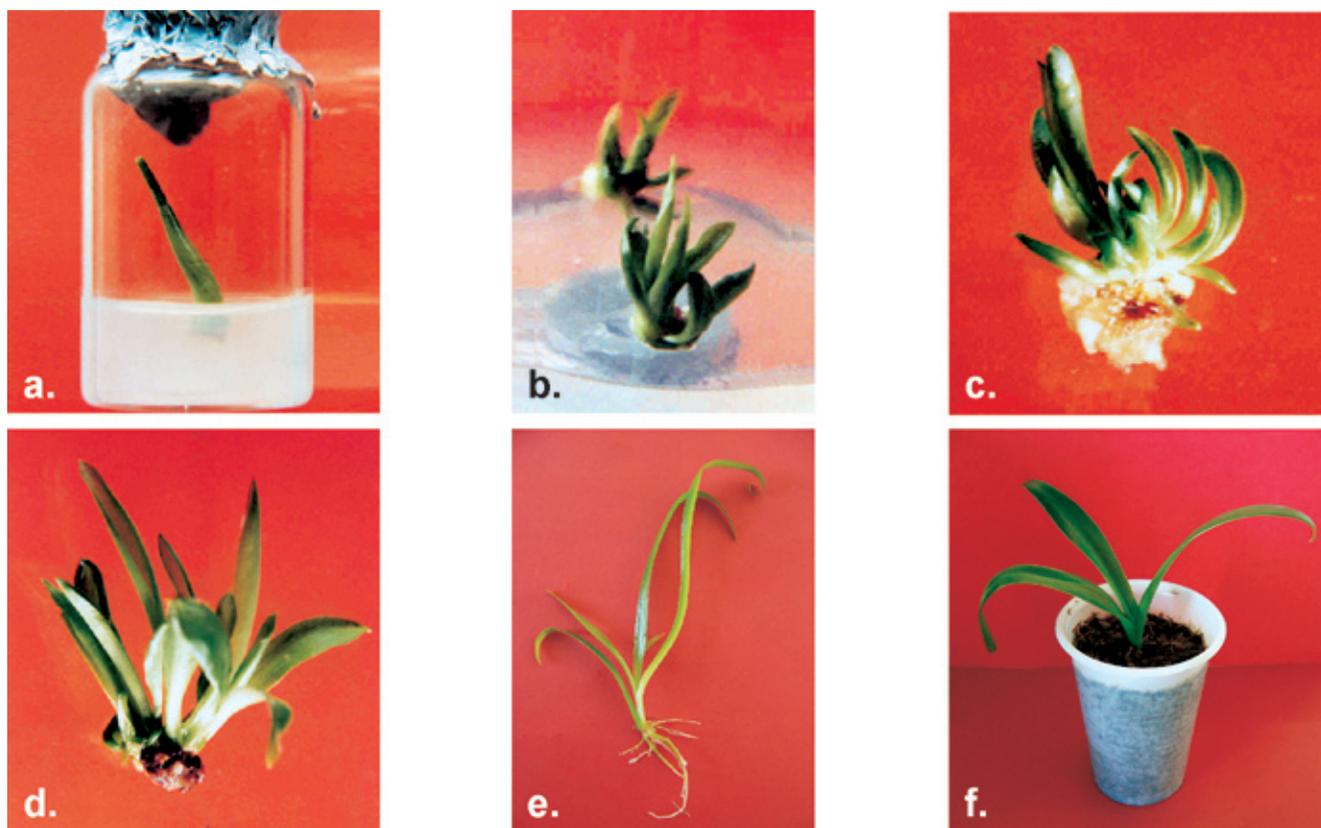


Figura 1. Micropropagación de *E. macrophylla* B.: a) ápice caulinar utilizado como explante primario; b) brotes axilares formados después de 60 d de iniciados los cultivos; c) brotes axilares múltiples desarrollados después de 120 d de cultivo en medio MS modificado suplementado con 35,52 μM de KIN más 2,69 μM de ANA; d) brotes axilares elongados después de 180 d de cultivo; e) brote enraizado, después de 30 d de cultivo en MS modificado, suplementado con 11,42 μM de AIA y f) plántula aclimatizada, después de 30 d en condiciones *ex vitro*.

sumergieron en una solución fungicida de Benlate® (1,0 g \cdot L⁻¹); luego se sembraron en vasos plásticos de 200 mL que contenían un sustrato estéril preparado con cascarrilla de arroz, tierra y arena en proporción 2:1:1. Las plántulas se mantuvieron en invernadero en módulos cubiertos con plástico durante 15 d y, posteriormente, en módulos descubiertos durante 20 d.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron aplicando análisis de varianza (Anova) y la prueba F, utilizando el programa SPSS Windows versión 11.5 (SPSS Inc.). Cuando el Anova indicó diferencias entre las medias de los tratamientos, se aplicó la prueba DHS (diferencia honestamente significativa) de Tukey para determinar los tratamientos que presentaron diferencias significativas.

Para establecer la efectividad de los tratamientos ensayados durante dos ciclos de proliferación, la media de brotes por explante se estimó mediante la relación:

$$\bar{x}_{BP} = \frac{\bar{x} \text{ brotes axilares por explante} \cdot \% \text{ explantes que forman brotes}}{100}$$

En cada tratamiento se cultivaron 20 unidades experimentales y cada tratamiento se repitió 2 veces.

Resultados y discusión

Los procesos organogénicos relacionados con neoformación de meristemas axilares, así como con su desarrollo, pueden ser suprimidos o retardados mientras los meristemas apicales estén activos. La inducción, crecimiento, desarrollo y proliferación de brotes axilares son, por lo general procesos promovidos por la incorporación de reguladores de crecimiento al medio de cultivo; comúnmente, las citoquininas suprimen la dominancia del meristemo apical y promueven la formación de brotes axilares.

Las citoquininas influyen sobre el desarrollo y fisiología de los vegetales, incluyendo germinación de se-

millas, control de la dominancia apical, interacción planta-patógeno, desarrollo de flores y frutos y senescencia de hojas, entre otros. Estos procesos también son influenciados por otros estímulos –como la luz y otros fitorreguladores–, y los resultados fisiológicos y de desarrollo reflejan respuestas altamente dependientes de tales estímulos (Shimizu y Mori, 2001; Haberer y Kieber, 2002). Se ha observado que cultivos de callos indiferenciados de zanahoria forman brotes o raíces, dependiendo de la cantidad relativa de citoquininas a auxinas en el medio de cultivo, y que la proporción –más que la cantidad absoluta– de esas dos hormonas determina la respuesta (Skoog y Miller, 1957). Según George (1996), una proporción auxina-citoquinina balanceada mantiene las células en un estado indiferenciado, mientras que una proporción alta de citoquinina a auxina promueve el desarrollo de brotes y una proporción baja promueve el desarrollo de raíces.

En esta investigación, 72-98% de los ápices caulinares inducidos *in vitro* en presencia de las diferentes concentraciones de BA, KIN y 2-IP, combinadas con ANA, fueron viables y la formación de brotes axilares fue evidente después de 8 semanas de cultivo (figuras 1a-d). Esta respuesta concuerda con las obtenidas en cultivos *in vitro* de otras agaváceas, como *A. arizonica* (Powers y Backhaus, 1989), *A. cantala* (Binh *et al.*, 1987), *A. fourcroydes* (Robert *et al.*, 1996) y *A. victoria-reginae* (Rodríguez *et al.*, 1996b), en las que un requerimiento de concentraciones moderadas a bajas de 2,4-D, IBA ó ANA, en combinación con una citoquinina, fue efectivo para inducir procesos organogénicos conducentes a la formación de brotes. Sin embargo, en otras agaváceas, como *A. sisalana* (Das, 1992) y *A. parrasana* (Santacruz *et al.*, 1999), la proliferación de brotes fue inducida en presencia de citoquininas sin requerirse la adición de auxinas al medio de cultivo.

En los cultivos *in vitro* de ápices caulinares de *F. macrophylla* B., la presencia de BA, KIN, 2-IP ó TDZ en combinación con 0,5 mg · L⁻¹ de ANA en el medio de cultivo afectó el porcentaje de explantes que formaron brotes axilares y, por ende, la media de brotes por explante (\bar{x}) (tabla 2). Los porcentajes de ápices caulinares que formaron brotes axilares fueron más elevados cuando se cultivaron en medio suplementado con KIN en concentraciones de 46,47 μM (98%) y de 32,52 μM (95%). En los cultivos de explantes realizados en medio con BA (13,31 y 22,19 μM) y con 2-IP (24,61 y 34,4 μM) en combinación con ANA se cuantificó 73-81% de explantes con brotes axilares. En los ápices caulinares cultivados en los medios con TDZ (0,225 y 0,45 μM) se cuantificaron los porcentajes más bajos

Tabla 2. Efecto del BA, KIN, 2-IP y TDZ en presencia de 2,69 μM de ANA sobre la proliferación y desarrollo de brotes axilares, a partir de ápices caulinares de *F. macrophylla*.

Tratamientos (μM)	Explantes con brotes axilares (%)	Brotes por explante (\bar{x})	Longitud \bar{x} brotes (cm)
BA 13,31	72 \pm 0,71c	4,18 \pm 0,31b	3,6 \pm 0,3bc
BA 22,19	74 \pm 2,12c	4,27 \pm 0,33b	3,5 \pm 0,1b
KIN 32,52	98 \pm 3,54d	6,63 \pm 0,24c	4,5 \pm 0,4d
KIN 46,47	95 \pm 1,41d	7,08 \pm 0,50c	4,3 \pm 0,1cd
2-IP 24,61	81 \pm 1,41cd	3,64 \pm 0,28b	4,4 \pm 0,1cd
2-IP 34,4	73 \pm 3,54c	3,8 \pm 0,07b	4,9 \pm 0,07d
TDZ 0,045	0a	0a	0a
TDZ 0,225	24 \pm 5ab	0,60 \pm 0,14a	3,1 \pm 0,14b
TDZ 0,45	9 \pm 12b	0,17 \pm 0,24a	3,6 \pm 0,14b

Promedios con una misma letra no difieren estadísticamente, según prueba de Tukey ($P=0,05$).

BA, 6-bencilaminopurina; KIN, 6-furfuril-aminopurina; TDZ, N-fenil N'-1,2,3-tidiazol-5-il úrea; 2-IP, 2-isopentenil adenina.

(24% y 9%) de explantes que formaron brotes axilares. Sin embargo, el TDZ promovió en cada ápice caulinar el desarrollo de un brote con 3 a 4 hojas de longitud mayor a 10 cm. En cambio, en cultivos de ápices tomados de brotes de *Yucca aloifolia* L, otra agavácea, se ha registrado un alto número de brotes (brotes por explante, 6,6), en cultivos realizados en medio suplementado con 4,5 μM de TDZ combinado con 1,1 μM de ANA (Atta-Alla y Van Staden, 1997).

Mediante análisis de varianza aplicado a los datos de brotes producidos (\bar{x} BP) en los cultivos de ápices caulinares en presencia de las citoquininas combinadas con ANA, se establecieron diferencias significativas entre los tratamientos (Fc: 193,415; Ft: 3,23; $\alpha = 0,05$), presentándose el valor más alto en los cultivos suplementados con KIN 46,47 μM (\bar{x} BP = 7,08) y 32,52 μM (6,63); valores medios se registraron en presencia de BA 13,31 μM (4,18) y 22,19 μM (4,27), 2-IP 24,61 μM (3,64) y 34,4 μM (3,8). En contraste, en los tratamientos en que se adicionó al medio de cultivo TDZ combinado con ANA, la producción de brotes por explante fue inferior a 1. En otras especies de agaváceas se han reportado medias de brotes por explante significativamente más elevadas; en cultivo de brotes axilares de *A. parrasana* (Santacruz *et al.*, 1999), la media de brotes por explante fue de 25,5 a 23,8 en MS suplementado con 2,4-D (0 a 0,04 μM) en combinación con BA (13,3; 26,6; 39,9 y 53,2 μM); mientras que en cultivos de callos organogénicos de *A. sisalana* (Nikam, 1997) en MS suplementado con 0,5 mg · L⁻¹ de KIN se reportó una media de 27,7 brotes por explante.

te. En cuanto al tamaño de los brotes producidos en la diferentes tratamientos realizados en esta investigación, la mayor longitud promedio (4,3-4,9 cm) la presentaron los brotes cultivados en presencia de KIN y 2IP, mientras que en presencia de BA y TDZ los brotes alcanzaron 3,1 a 3,6 cm de longitud.

Enraizamiento

Entre 90% y 100% de los brotes desarrollados (longitud ≥ 3 cm) enraizaron después de 15 a 30 d de cultivo en medio suplementado con AIA (figura 1e) o AIB, o en medio sin auxinas. El AIA en el medio de cultivo fue más efectivo (100%) para inducción y desarrollo radicular que el AIB (92%) y que el medio sin auxinas (90%). Aunque en todos los tratamientos ensayados se cuantificaron altos porcentajes de brotes enraizados, la diferencia más notoria entre ellos fue el menor tiempo que requirieron para enraizar los brotes cultivados en presencia de auxinas, comparado con el tiempo requerido por aquellos cultivados en ausencia de ellas (tabla 3). En este sentido, Villalobos *et al.* (1991) y Yépez *et al.* (2004) han reportado que brotes de *A. atrovirens* y *A. cocui*, respectivamente, pueden enraizar cultivándolos en medio sin auxinas, aunque la formación y desarrollo radicular puede estimularse más rápidamente si los brotes se cultivan en medio con sales diluidas al 50% y suplementado con 2,46 μM de AIB. Resultados semejantes reportaron Santacruz *et al.* (1999), quienes indujeron enraizamiento de brotes de *A. parrasana* en medio sin auxinas o suplementado con 9,8-39,2 μM de AIB, sin observar diferencias significativas entre los tratamientos. Además, Hazra *et al.* (2002) reportaron enraizamiento de brotes de *A. sisalana* 20-25 d después de iniciado el cultivo en MS suplementado con 11,42 μM de AIA. En otras especies de agáveas, como *A. arizonica* (Powers y Backhaus, 1989), *A. cantala*, *A. furcroydes* (Binh *et al.*, 1990), *A. sisalana* (Binh *et al.*, 1990; Das, 1992), el cultivo de los brotes en medio basal fue suficiente para estimular la formación y el desarrollo de raíces.

Tabla 3. Enraizamiento de brotes de *E. macrophylla* cultivados en MS suplementado o no con AIA y AIB.

Tratamiento (μM)	Brotes enraizados (%)	
	15 d	30 d
AIA 11,42	95	100
AIB 2,46	83	92
Sin RC	50	90

Aclimatización

En condiciones de invernadero, la disminución progresiva de la humedad relativa y el incremento de la intensidad de luz, así como la siembra en un sustrato compuesto por cascarilla de arroz molida, arena de río y tierra en proporción 1:1:1, fueron condiciones físicas favorables para el proceso de aclimatización de plántulas, obteniéndose después de 30 d de iniciado 94% de plántulas viables con apariencia normal y crecimiento activo (figura 1f).

Conclusión

El proceso de micropropagación de *E. macrophylla*, a partir de ápices caulinares procedentes de bulbillos hasta regenerar y endurecer plántulas, implica un periodo de 8 meses; posteriormente, cada ciclo proliferativo se desarrolla en 60 d. Este protocolo puede aplicarse para selección *in vitro* de materiales élites y para su propagación en gran escala.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al Convenio del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología ‘Francisco José de Caldas’ (Colciencias) y el Banco Interamericano de Desarrollo (Bid) y a la Dirección de Investigaciones de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC) por el aporte económico asignado para el desarrollo de este trabajo. A los integrantes del grupo de investigación Bioplasma-UPTC, a la Cadena Productiva del Fique Regional Boyacá y a la Cadena Productiva Nacional del Fique (Cadefique), por su interés en la realización de esta investigación, así como a todos los cultivadores de fique que suministraron el material vegetal utilizado en ella.

Literatura citada

- Atta-Alla, H. y Van Staden. 1997. Micropropagation and establishment of *Yucca aloifolia*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 48, 209-212.
- Binh, L.T., L.T. Muoi, H.T.K. Oanh, T.D. Thang y D.T. Pong. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 23, 67-70.
- Castro, C.L., V.M. Loyola, J.L. Chan y M.L. Robert. 1990. Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plants of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 22, 147-151.
- Das, T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 31, 253-255.
- Devesa, J. 1997. Plantas con semillas, familia *Agavaceae*. En: Izco, J., E. Barreno, M. Costa y J. Devesa (eds.). Botánica. Interamericana McGraw-Hill, España. 781 p.

- Eastmond, A., J.L. Herrera y M.L. Robert. 2000. Contribución a la biotecnología del henequén. pp. 59-71. En: Eastmond, A., J.L. Herrera y M.L. Robert. (eds.). La biotecnología aplicada al henequén: alternativas para el futuro. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), México.
- George, E. 1993/1996. Plant propagation by tissue culture. In practice. Part 2. Exegetics, Easter Press, England. 786 p.
- González, G., S. Alemán, F. Barredo y M.L. Robert. 2001. Embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem. Biotecnología Vegetal 2(1), 3-8.
- Groenewald, E.G., D.C.J. Wessels y A. Koeleman. 1977. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (Agavaceae). Z. Pflanzenphysiol. 81, 369-373.
- Haberer, G. y J.J. Kieber. 2002. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. Plant Physiol. 128, 354-362.
- Harza, S.K., S. Das y A.K. Das. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 70, 235-240.
- Martínez, P.A., L.P. Ortega, V. Chávez y R. Bye. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: considerations for its conservation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 74, 135-142.
- Madrigal, L.R., E.F. Pineda y J.I. Rodríguez. 1990. Agave. pp. 206-227. En: Ammirato, P.V., D.A. Evans, W.R. Sharp y Y.P.S. Bajaj. (eds.). Handbook of plant cell culture. Vol. 5. Ornamental species. Mc Graw-Hill Publishing Co., New York.
- Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial [MAVDT], Sociedad de Agricultores de Colombia [SAC] y Federación Nacional de Cultivadores de Fique [Fedefique]. 2002. Guía ambiental para el subsector fiqueero. Bogotá. 63 p.
- Muñoz, P.Y., L.A. Pérez, T.S. Pérez, P. Alcántara, M. Sagrera y C. Pimentel. 2004. Metodología para el mejoramiento genético del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) con el empleo de técnicas biotecnológicas. En: http://www.bioplantas.cu/bioinformatica/taller_04_BV.pdf; consulta: febrero 2004.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 15, 473-493.
- Nikam, T.D. 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 51, 225-228.
- Nikam, T.D., G.M. Bansude y A. Kumar. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex. Engelm). Plant Cell Rpt. 22, 188-194.
- Powers, D.E. y R.A. Backhaus. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 16, 57-60.
- Robert, M.L., J.L. Herrera, F. Contreras y K.N. Scorer. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 8, 37-48.
- Rodríguez, G.B., M.A. Gutiérrez y R.F. Santacruz. 1996a. Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales en agaváceas para zonas áridas. pp. 57-86. En: Izquierdo, J. y G. Palomino (eds.). Técnicas convencionales y biotecnológicas para la propagación de plantas de zonas áridas. Fao Regional Office for the Latin American and Caribbean Region, Santiago de Chile.
- Rodríguez, G.B., M.A. Gutiérrez y D.B. Acosta. 1996b. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46, 85-87.
- Santacruz, R.F., P.H. Gutiérrez, y G.B. Rodríguez. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 56, 163-167.
- Shimizu, S.S. y H. Mori. 2001. Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. Plant Physiol. 127, 1403-1413.
- Skoog, F. y C.O. Miller. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11, 118-131.
- Villalobos, V.V., M.J. Mejía y A.H. Escobar. 1991. Micropropagación de opuntias y ágaves. pp. 643-650. En: Roca, W.M. y L.A. Mroginski. (eds.). Cultivo de tejidos en agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali (Colombia).
- Yépez, G., E. García y E. Vargas. 2004. Notas preliminares sobre la propagación clonal *in vitro* de *Agave cocui* Trel. En: <http://www.investigacion.unefm.edu.ve.pdf>; consulta: junio 2004.