

Influencia de la concentración de agar sobre la multiplicación *in vitro* de *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf

Ricardo J. Licea Moreno^{1*}, Maité Fernández Moreno¹, Karen Alvarado Ruffo¹ y Rafael Gómez Kosky². *Autor para correspondencia.

1. Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, Universidad de Granma. Apto. 21, Bayamo, Granma. CP 85100, Cuba. e-mail : licea@udg.co.cu

2. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5^{1/2}, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: rgkosky@uclv.edu.cu

RESUMEN

En el trabajo se presentan los resultados sobre la multiplicación *in vitro* de la Caña Santa (*Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf.), especie medicinal de gran utilidad por poseer propiedades analgésicas, antiinflamatorias, hipotensoras, entre otras, aprovechadas en la elaboración de medicamentos de alta demanda popular. El objetivo de este trabajo consistió en determinar la influencia de la concentración de agar del medio de cultivo durante la fase de establecimiento sobre la propagación *in vitro* de la Caña Santa. Fueron preparados tres tratamientos: (1) medio de cultivo líquido con soporte de papel de filtro, (2) gelificación con 3 g.l⁻¹ de agar (BIOCEN) y (3) gelificación con 6 g.l⁻¹ de agar (BIOCEN). El medio de cultivo para el establecimiento estaba compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962) suplementado con las vitaminas de Heinz y Mee (1969), 100 mg.l⁻¹ de mioinositol, 0.2 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 20 g.l⁻¹ de sacarosa; el pH fue ajustado a 5.7 antes del autoclaveado. Los ápices una vez desinfectados, fueron extraídos e inoculados en las diferentes variantes antes mencionadas; incubándose en condiciones de iluminación solar. Posteriormente los ápices fueron subcultivados a un medio de cultivo de multiplicación compuesto por las sales Murashige y Skoog (1962), 1 mg.l⁻¹ de tiamina, 100 mg.l⁻¹ de mioinositol, 0.3 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 30 g.l⁻¹ de sacarosa, realizándoseles cinco subcultivos de multiplicación cada 21 días. Los resultados demostraron la importancia de la concentración de agar del medio de cultivo sobre el establecimiento y la posterior respuesta *in vitro* de la Caña Santa, observándose su influencia en la fase de multiplicación hasta el 2^{do} subcultivo. Se alcanzó como promedio 3.43 nuevas yemas axilares en los explantes provenientes del medio de cultivo suplementado con 3 g.l⁻¹ de agar.

Palabras clave: Caña Santa, cultivo de tejidos, micropropagación, plantas medicinales

ABSTRACT

Here are presented the results on *in vitro* multiplication of lemon grass (*Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf.); it is a very important medicinal plant because its analgesic, antiinflammatory and hipotensor properties, among others, useful to elaborate several medicaments with a high popular acceptance. The main aim of this research was to set up the influence of agar concentration in culture medium during *in vitro* establishment on multiplication of lemon grass. Were used three treatments: (1) liquid medium with filter paper bridges, (2) 3 g.l⁻¹ of agar (BIOCEN) and (3) 6 g.l⁻¹ of agar (BIOCEN). The explants were inoculated on a culture media containing Murashige and Skoog salts (1962), Heinz and Mee vitamins (1969), myoinositol 100 mg.l⁻¹, 6-BAP 0.2 mg.l⁻¹ and sucrose 20 g.l⁻¹. Meristematic tips were inoculated on the treatments described above under sun light conditions, once disinfected. The explants Influence of agar concentration on *in vitro* multiplication of *Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf. were maintained 21 days in this culture media and later it is were subcultured 5 times each 21 days, on the same multiplication culture media containing Murashige and Skoog salts (1962), tiamine 1 mg.l⁻¹, myoinositol 100 mg.l⁻¹, 6-BAP 0.3 mg.l⁻¹ and sucrose 30 g.l⁻¹. The pH was 5.7 for all culture media. The results showed the relevance of agar concentration during *in vitro* establishment on multiplication of lemon grass. Differences among treatments until the 2nd subculture was observed. 3.43 new axillary shoots from each explant cultured on a culture media supplemented with 3 g.l⁻¹ of agar was reached.

Key words: lemon grass, medicinal plants, micropropagation, tissue culture

INTRODUCCIÓN

La Caña Santa (*Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf.) es una planta originaria del sudeste asiático capaz de almacenar en sus células parenquimatosas un aceite esencial de color amarillento rico en sustancias de gran interés. Este aceite tiene como componentes

fundamentales el citral, aproximadamente 80% en forma de sus dos isómeros: neral 33,5% y geranial 45,9%, y el mirceno 12,8% (Chalchat *et al.*, 1997), a partir de los cuales se pueden sintetizar varias sustancias de aplicación industrial. Es propósito del Ministerio de Salud Pública de Cuba satisfacer la creciente demanda de los medicamentos de origen

natural, y dentro de ellos los provenientes de la Caña Santa, lo que implica aumentar las áreas de cultivo y buscar las vías para elevar sus rendimientos.

Una de las principales dificultades que presenta el cultivo de la Caña Santa en Cuba es que, por causa de la poca atención de que ha sido objeto, algunos componentes del rendimiento, como la altura de la planta, se han visto afectados, probablemente, debido al envejecimiento del material de propagación utilizado a lo largo de más de 100 años de explotación, sin realizar el debido rejuvenecimiento, entre otros factores negativos que pueden haber influido sobre su comportamiento.

El cultivo *in vitro* es una herramienta muy útil para lograr la recuperación del vigor de las especies vegetales que fisiológicamente han ido degenerando. En varias plantas medicinales se ha empleado esta tecnología para el restablecimiento de las características de genotipos que han degenerado como *C. flexuosus* (Nees) Wats (Nayak *et al.*, 1996).

Por estas razones se decidió iniciar las investigaciones sobre la micropropagación de la Caña Santa como una vía para mejorar la calidad del material de plantación, con el objetivo de elevar las producciones agrícolas de esta especie, además de contar con un protocolo de multiplicación *in vitro* que permitiera la rápida propagación de clones élites seleccionados.

Es de significar la existencia de pocos reportes en la literatura sobre el empleo del cultivo de tejidos en especies del género *Cymbopogon*, y especialmente sobre la micropropagación, motivo por el que utilizamos como referencia los resultados logrados en nuestro país en el cultivo *in vitro* de la caña de azúcar, citados por Jiménez y Pérez (1986), IBP (1995) y Jiménez (1995), por la similitud taxonómica existente entre ésta y la caña de azúcar.

Frecuentemente en los trabajos de micropropagación de plantas se le presta mayor atención a la composición hormonal del medio de cultivo y se soslaya la importancia de factores como el tipo y concentración de agar, elemento que puede convertirse, en algunos casos, en decisivo para el éxito ulterior del establecimiento y multiplicación *in vitro*. Al respecto Orellana (1998) señaló que la existencia de diferentes tipos de agar con las más variadas características implican la necesidad de realizar pruebas con varios suministradores y tipos de gelificantes y posteriormente estandarizar todo el proceso de preparación de medio de cultivo para la especie a propagar.

Teniendo en consideración lo analizado anteriormente y la necesidad de iniciar los trabajos de cultivo *in vitro* de la Caña Santa en Cuba, nos propusimos

determinar la influencia de la concentración de agar durante su establecimiento *in vitro* sobre la multiplicación, vía yemas axilares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron seleccionados vástagos de Caña Santa vigorosos sin daños mecánicos, provenientes de plantaciones de producción, los que fueron desinfectados con alcohol al 70% durante 30 minutos. Posteriormente los ápices fueron extraídos en la cabina de flujo laminar e inoculados en un medio de cultivo compuesto por las sales Murashige y Skoog (1962) suplementado con las vitaminas de Heinz y Mee (1969); 100 mg.l⁻¹ de mioinositol; 0.2 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 20 g.l⁻¹ de sacarosa. Para determinar la influencia de la concentración de agar sobre el establecimiento y la multiplicación se utilizaron tres tratamientos: (1) medio de cultivo líquido con soporte de papel de filtro, (2) medio de cultivo gelificado con 3 g.l⁻¹ de agar (BIOCEN) y (3) medio de cultivo gelificado con 6 g.l⁻¹ de agar (BIOCEN). A los 21 días de iniciado el cultivo se evaluó el número de ápices regenerados y las yemas axilares brotadas. Se consideraron ápices regenerados aquellos que habían manifestado síntomas de crecimiento: aumento de tamaño, aparición de coloración verde, formación de hojas y brotación de las yemas axilares.

Los ápices meristemáticos regenerados fueron inoculados, durante el 1^{er} subcultivo, en un medio de cultivo compuesto por las sales Murashige y Skoog (1962); 1 mg.l⁻¹ de tiamina; 100 mg.l⁻¹ de mioinositol; 0.3 mg.l⁻¹ de 6-BAP y 30 g.l⁻¹ de sacarosa, solidificado con agar con 6 g.l⁻¹ (BIOCEN); a partir del 2^{do} subcultivo de multiplicación los explantes fueron inoculados en el mismo medio de cultivo, pero sin agar. En todos los casos se ajustó el pH a 5.7. Se realizaron cinco subcultivos de multiplicación, evaluándose cada 21 días la cantidad de yemas axilares brotadas.

Los resultados del establecimiento de los ápices meristemáticos *in vitro* fueron procesados utilizando un ANDEVA de clasificación simple, luego de aplicar la transformación de $\text{ARCSE } \sqrt{X}$, donde X es el valor del porcentaje de regeneración y muerte de los ápices; mientras que para las variables número de yemas axilares brotadas y cantidad de subcultivos de multiplicación se empleó un ANDEVA de clasificación doble, utilizándose la prueba de Newman-Keuls para la comparación de medias (Lerch, 1987). Todo el procesamiento estadístico se efectuó con el paquete STATISTICA versión 4.2 para Window 95.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El establecimiento constituye una de las fases

cruciales dentro de la micropropagación, pues el brusco cambio del ambiente físico-químico a que es sometido el material vegetal en ocasiones, provoca su muerte; además el resultado posterior depende, en gran medida, de crear las condiciones favorables para la adaptación del explante a esta condición estresante.

Como puede observarse en la tabla 1 se logró el establecimiento exitoso de la mayoría de los explantes inoculados. A partir del segundo día de iniciado el cultivo los ápices comenzaron a tomar una coloración verde por efecto de la incidencia de la luz solar sobre ellos. En el medio de cultivo líquido con soporte de papel los ápices tuvieron

un crecimiento pobre en comparación con los dos tratamientos en los que se empleó agar, evidenciando éstos últimos un desarrollo más significativo, al observarse la elongación de los primordios foliares (datos no mostrados), siendo más pronunciado en el medio de cultivo gelificado con 3 g.l⁻¹ de agar. Este comportamiento puede atribuirse a que los ápices en el tratamiento 1 no se encuentran en contacto directo con el medio de cultivo y sus componentes, sino que estos son «transportados» lentamente por capilaridad a través del papel de filtro, encontrándose menos disponibles que cuando son inoculados los explantes dentro del medio de cultivo agarificado.

Tabla 1. Influencia de la concentración de agar en el medio de cultivo sobre el establecimiento *in vitro* de la Caña Santa.

Tratamiento	Total de Apices Regenerados		Apices		
	Apices		%	Muertos	
Medio líquido	41	40	97.56 a	1	2.44 a
3 g.l ⁻¹	42	42	100.00 a	0	0.00 a
6 g.l ⁻¹	33	33	100.00 a	0	0.00 a

CV: 0.24 %

DS: 0.049

Es muy frecuente que una gran cantidad de trabajos de micropropagación estén relacionados con la composición hormonal del medio de cultivo como elemento decisivo en la respuesta *in vitro* del material vegetal, sin embargo muchos autores han investigado acerca de la influencia del ambiente físico, demostrando su importancia, frecuentemente subestimada en investigaciones de este tipo. Es reconocida la influencia del fotoperíodo (Jaramillo y Summers, 1991), la humedad relativa (Debergh *et al.*, 1992), el tipo y posición del explante en el medio de cultivo (Mroginsky *et al.*, 1996 ; Santarem *et al.*, 1997), el tipo y concentración de agar (Jaramillo y Summers, 1991 ; Santarem *et al.*, 1997), entre otros factores, sobre el cultivo de tejidos y órganos vegetales.

Aunque el comportamiento del número de ápices meristemáticos regenerados de Caña Santa fue similar para los tratamientos utilizados, las diferencias si fueron evidentes en la siguiente fase del cultivo *in vitro*. La influencia de la concentración de agar del medio de cultivo se observó aún en el segundo subcultivo de multiplicación (Fig. 1), siendo el mejor tratamiento en el que se empleó la concentración de agar de 3 g.l⁻¹. Sin embargo a partir del tercer subcultivo de multiplicación el comportamiento de los tratamientos fue muy similar, como una evidencia de que probablemente los explantes establecidos en el medio de cultivo líquido con soporte de papel y en el que poseía 6 g.l⁻¹ de agar, han alcanzado un equilibrio en cuanto al contenido endógeno de agua y nutrientes que les permitía tener una mejor respuesta a la variable analizada.

Las diferencias encontradas entre los tratamientos gelificados pudieron estar motivadas por una mayor retención de los componentes del medio de cultivo en la variante con 6 g.l⁻¹ de agar en relación con la de 3 g.l⁻¹ de agar, como ya fue sugerido por Debergh (1983), lo que afectaría, sin duda alguna, el crecimiento y desarrollo de los explantes cultivados en este tratamiento (6 g.l⁻¹); corroborándose esta opinión al comprobarse la existencia en el quinto subcultivo de diferencias estadísticamente significativas entre éste y los tratamientos con medio de cultivo líquido y el suplementado con 3 g.l⁻¹ de agar; resultando entonces imprescindible valorar la concentración de agar a utilizar en los trabajos de cultivo *in vitro* de la Caña Santa, con el objetivo de reducir los costos de la micropropagación, no sólo por la utilización del agar en sí mismo, sino además por la reducción de los índices de multiplicación.

La existencia de diferencias estadísticamente significativas para la interacción estado físico del medio de cultivo - número de subcultivos previene de un posible comportamiento futuro influenciado por estas causas de variación, elementos que se deben tener en consideración en posteriores trabajos de multiplicación *in vitro* de la Caña Santa, pues en algunas especies, como el plátano, la cantidad de yemas axilares *de novo* decrece ya al segundo subcultivo, cuando se emplean medios de cultivos líquidos, sin embargo en la caña de azúcar el comportamiento es diferente, probablemente debido a la inducción de yemas adventicias (Orellana, 1998).

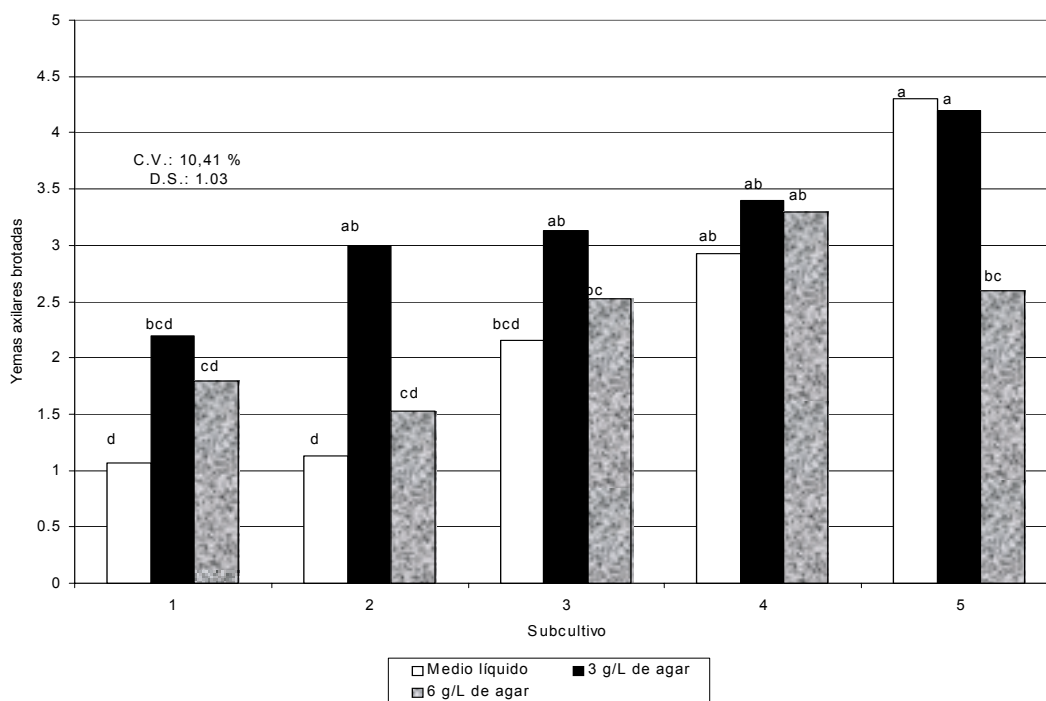


Figura 1. Influencia de la concentración de agar sobre la multiplicación *in vitro* de la Caña Santa

Al realizar un análisis de los resultados se pudo comprobar que las diferencias, entre los tratamientos en relación con el número de yemas axilares brotadas, estaban influenciadas por la

condición física del medio de cultivo al manejar la concentración de agar, poniéndose de manifiesto la importancia de esta causa de variación en la multiplicación *in vitro* de la Caña Santa (Tabla 2).

Tabla 2: Comportamiento del número yemas axilares brotadas de la Caña Santa por tratamientos y subcultivos.

Tratamiento	Número de Yemas Axilares Regeneradas	Subcultivo	Número de Yemas Axilares Regeneradas
Medio líquido	2.64 b	1	1.30 d
3	3.43 a	2	1.89 c
6	2.49 b	3	2.61 b
C.V.: 10.41 %		4	3.21 a
D.S.: 1.03		5	3.71 a

La cantidad de yemas axilares brotadas se incrementó desde el primer subcultivo hasta el quinto (Tabla 2), pudiendo considerarse como una señal del rejuvenecimiento que ha manifestado el material *in vitro* por efecto del empleo de las técnicas del cultivo de tejidos; aunque esto puede estar relacionado también con los niveles endógenos de 6-BAP que han ido acumulando los brotes, sin embargo no creemos que sea esta la causa de este comportamiento, pues se puede observar una tendencia a estabilizarse, en vez de incrementarse, el número de yemas brotadas por explante a partir del cuarto subcultivo, elemento que es necesario definir al aumentar el número de subcultivos en trabajos posteriores. En caña de azúcar se observó que en los primeros subcultivos el coeficiente de multiplicación es más bajo, pero a partir de la

tercera o cuarta multiplicación comienza el incremento de éste (Jiménez, 1995).

CONCLUSIONES

Se logró el establecimiento y multiplicación *in vitro* de la Caña Santa, demostrándose la importancia de la influencia del estado físico del medio de cultivo sobre el número de yemas axilares brotadas. Estos resultados pueden ser de gran utilidad para la realización de posteriores trabajos de micropropagación de esta planta medicinal.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración del Ing. Rolín Vidal Cisnero en el suministro del material vegetal para el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

- Chalchat JC, Garry RF, Menut C, Lamaty G, Malhuret R y Chopineau J (1997) Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 9: 67-75
- Debergh P (1983) Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant* 59: 270-276
- Debergh PC, De Meester J, De Riek J, Gillis S, y Van Huylenbroeck J (1992) Ecological and physiological aspects of tissue-culture plants. *Acta Bot. Neerl.* 41 (4): 417-423
- Jiménez *et al.* (1997) Instructivo técnico para la micropropagación de la caña de azúcar. IBP Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas Santa Clara. Cuba pp. 8
- Jaramillo J y Summers WL (1990) Tomato anther *callus* production: solidifying agent and concentration influence on induction of *callus*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115(6): 1047-1050
- Jaramillo J y Summers WL (1991) Dark-light treatments influence induction of tomato anther culture. *HortScience* 26 (7): 915-916
- Jiménez E (1995) Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum ssp.* híbrido). Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba
- Jiménez E y Pérez J (1986) Micropropagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum sp.* híbrido). Trabajo de Diploma. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba
- Lerch G (1987) La experimentación agrícola en las ciencias biológicas y agrícolas. Editorial Academia. 2^{da} Edición. Tomos I y II
- Mroginsky LA, Bernasconi NK, Sansberro PA y Rey HY (1996) Micropropagación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): efecto del origen del explante en el establecimiento *in vitro* de los cultivos. *Rev. Inter. Botánica Experimental* 59 (1/2):161-170
- Nayak S, Debata BK y Sahoo S (1996) Rapid propagation of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* (Nees) Wats.) through somatic embryogenesis *in vitro*. *Plant Cell Report* 15: 367-370
- Orellana PA (1998) Propagación vía organogénesis. En: Pérez Ponce JN (ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de la Plantas, Santa Clara, p. 151-178
- Santerem ER, Pelissier B y Finer JJ (1997) Effect of explant orientation, pH, solidifying agent and wounding on initiation of soybean somatic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 33: 13-19