

# El cultivo *in vitro* como alternativa de la recuperación henequenera (*Agave fourcroydes*)

✉ Gerardo González<sup>1</sup>, Silvia Alemán<sup>1</sup>, Reynaldo Trujillo<sup>2</sup>, Miguel Keb<sup>3</sup>, Enildo Abreu<sup>1</sup>, Felipe Barredo<sup>3</sup>, Manuel L. Robert<sup>3</sup>, Rodobaldo Ortiz<sup>4</sup>, María Teresa Cornides<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas «Camilo Cienfuegos», Cuba; gerardo.gonzalez@umcc.cu.

<sup>2</sup>Centro de Bioplasmas, Universidad de Ciego de Ávila, Cuba.

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán, México.

<sup>4</sup>Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Cuba.

<sup>5</sup>Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba.

## RESUMEN

La dificultad para producir posturas de alta calidad, por el método tradicional en un período corto de tiempo en henequén, condujo al empleo de técnicas biotecnológicas con el objetivo de establecer las vías organogénicas y embriogénicas de propagación. En la primera etapa se estableció la micropropagación como una tecnología cubana viable. En una segunda etapa, se logró la embriogénesis somática en henequén. Ambas vías de propagación fueron superiores a la tradicional. El estudio para evaluar la variabilidad fenotípica y genómica en plantas propagadas *in vitro* indicó existencia de variabilidad genética en una planta con propagación asexual. Además la separación de los individuos en grupos, se correspondió con el agrupamiento de la planta donante y sus descendientes, lo que justifica la alta similitud de la descendencia con sus progenitores. Por lo tanto se evidencia que con la propagación *in vitro* se logra estabilidad genética. Los rendimientos en fibra de las plantas propagadas *in vitro* fueron superiores y la cosecha se realizó a los tres años, tiempo inferior a los 5 requeridos para las plantas propagadas tradicionalmente.

## Introducción

El henequén es una especie perenne de propagación vegetativa, sobre la que existen pocos estudios [1, 2, 3]; lo que ha conllevado a un limitado conocimiento de su origen, variación y tendencias evolutivas.

El imperativo de la economía mundial sobre la conservación de los recursos bióticos y su diversidad genética así como a favor de la disminución de la contaminación por plásticos y otros productos dañinos al hombre y al ambiente, precisa de la caracterización, recuperación y conservación de los recursos genéticos disponibles para hacer de ellos un uso más racional.

El henequén continúa siendo un cultivo altamente productivo en áreas ecológicas limitantes por escasez de agua y suelo [4]. Tiene además alto potencial de uso como fuente de productos naturales como esteroides y detergentes a partir de sus sapogeninas [5], celulosa a partir de su fibra [6] y principios activos para la industria farmacéutica y la industria agropecuaria [7].

El henequén, al igual que otros representantes del género *Agave*, es un clon pentaploide ( $n=30$ ) con reducida fertilidad [4], donde la escasa reproducción sexual que pudiera ocurrir es excluida por la práctica habitual de cortar la inflorescencia [8], para evitar la influencia negativa que la floración causa a la calidad de la fibra.

En la actualidad la falta de posturas para complementar los planes de siembra que permitan solventar la demanda de fibra en el presente y futuro, ha conllevado a la plantación de todo tipo de material, con la consecuencia de generar plantaciones no uniformes y de bajos rendimientos, que han contribuido al mismo tiempo al deterioro gradual de las mismas. Los rendimientos en fibra se presentan con un descenso de 1.2

tn/ha a un rango de 0.6 a 0.7 tn/ha, lo que obliga al estado cubano a importar fibra de Brasil.

Con sólo el empleo de la propagación tradicional se hace casi imposible el establecimiento de plantaciones de alta calidad en breve tiempo y con ello se hace más lejano el imperativo de la recuperación henequenera. De ahí la relevancia de lograr tecnologías que puedan aplicarse a gran escala, con germoplasma seleccionado y que resulten económicamente atractivas, para devolverle a esta fibra vegetal su valor económico.

La aplicación del cultivo *in vitro* al género *Agave* se inició en la década de los años 70 [9, 10, 11] y los protocolos propuestos se basan fundamentalmente en la micropropagación con costos elevados, por lo que se precisa la necesidad de ajustar la propuesta por vía organogénica, para lograr una eficiente propagación a gran escala.

La embriogénesis somática, un sistema de regeneración más eficiente, sólo se ha alcanzado con éxito en una especie del género *Agave* [12]. De lograrse este proceso en henequén, se podría potenciar la producción de plantas (propagación masiva, semilla artificial) y se dispondría además, de un protocolo de vital importancia, para futuros trabajos de transformación genética.

La inestabilidad genética es un problema asociado con la industria de la propagación [13]. Yang *et al.* [14] observaron variaciones somaclonales en muchos tipos de plantas que han sido regeneradas a través de la técnica de cultivo *in vitro*, lo que ha obligado a usar sistemas de detección con nivel molecular para la identificación de estas variaciones y conocer el grado de estabilidad genética de las plantas micropropagadas [15, 16]. El análisis genético es un complemento importante de los procesos de propagación por lo que en

1. Casas A, Caballero J, (1996). Traditional management and morphological variation in *Leucaena esculenta* (Fabaceae: Mimosoideae) in the Mixtec Region of Guerrero, Mexico. *Economic Botany* 50: 167-81.

2. 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 México. *Economic Botany* 51:279-92.

3. Zárate S, (1997). Domestication of cultivated *Leucaena* (Leguminosae) in Mexico: sixteenth century documents. *Economic Botany* 51:238-50.

4. Colunga P, (1998). Origen, variación y tendencias evolutivas del Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). *Bol. Soc. Bot. México* 62:XX-XX.

5. Robert ML, Herrera JL, Chan JL, Contreras F, (1992). Micropropagation of *Agave* spp. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 19: p. 306-29.

6. Cazaurang MN, Peraza SR, Cruz CA, (1990). Dissolving-grade pulps from henequen fibers. *Celulose Chemistry Technology*. 24:629-38.

7. Eastmond A, Herrera JL, Robert ML, (2000). La biotecnología aplicada al Henequén: Alternativas para el futuro. Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. México: p. 17-25.

8. Peña E, González G, Berrillo A, Sosa D, Arteaga M, Rittoles D, Pérez D, Torriente Z, (1996-1997). Tecnología para la micropropagación del Henequén a gran escala. *Rev. Jardín Botánico Nacional*. 17-18: 169-76.

9. Murashige T, (1974). Manipulation of Organ Initiation in Plant Tissue Culture. *Botanical Bulletin of Academic Sinica*, 18:1-24.

este trabajo se empleó la técnica denominada AFLP (análisis de la longitud de los fragmentos polimórficos amplificados), descrita por Voss *et al.* [17] la cual es confiable, repetible y ofrece un alto nivel de utilidad cuando se compara con otros sistemas de marcadores [18], además permite identificar el polimorfismo en las poblaciones en estudio, sin un conocimiento previo de su ADN.

En la presente investigación, el uso de la técnica molecular, análisis de la longitud de los fragmentos polimórficos amplificados (AFLP), junto con el análisis de la variación morfológica, permitirá contar con dos enfoques complementarios para detectar tanto los grados de variabilidad como las variantes clonales de mayor interés productivo y evaluar su estabilidad genética.

## Materiales y métodos

Esta investigación se desarrolló en los laboratorios del Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos" (CEBIO) y en el grupo de propagación clonal del Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. El financiamiento fue aportado parcialmente por proyecto territorial aprobado por el CITMA de Matanzas en el programa "Producción de semilla de alta calidad" y beca de la Universidad de las Naciones Unidas.

### Preparación y selección del material vegetal

Se realizó una selección de los individuos de mejores características agroproductivas según análisis de componentes principales derivados de una caracterización morfológica de individuos propagados por vía tradicional.

Para la micropropagación se utilizó como fuente de explante rizoma de las plantas seleccionadas. Una vez en el laboratorio, se les eliminó las hojas más externas, se lavaron con detergente y se dejaron bajo flujo de agua corriente por 15 minutos. Para la desinfección se empleó el esquema que a continuación relacionamos:

Los fragmentos que contenían el ápice se sumergieron en una solución de antibiótico (Agrimycin 0.06% w/v) durante 1 hora, a continuación se mantuvieron en un área aclimatizada por espacio de 48 horas.

Posterior a este período se pasaron por una solución de hipoclorito de sodio (5% v/v) durante 20 min., después de lo cual se lavaron dos veces con agua destilada estéril por un período de 10 min. cada uno. En esta fase se eliminan las partes dañadas por el cloro con la ayuda de un cuchillo filoso, a continuación se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (2.5% v/v) y se realizaron dos lavados de igual forma que los primeros, con la diferencia de que estos se llevaron a cabo bajo condiciones de flujo laminar.

Una vez desinfectados los ápices, de acuerdo a lo antes descrito se procedió a la reducción del mismo, mediante el auxilio de pinzas finas y bisturí, a fin de eliminar todo lo visualmente dañado. El tamaño de los ápices aislados osciló entre 1.5 y 2.0 cm de longitud. Después de aislados los ápices, se mantuvieron en agua destilada estéril hasta el momento de su implantación en el medio de cultivo, para evitar su deshidratación. En la inducción de la embriogénesis somática se utilizaron como explantes: ápices con 35 días de

establecidos *in vitro*, base de hojas de vitroplántulas obtenidas según tecnología propuesta por Peña *et al.* [8] y rudimentos seminales (preantesis) provenientes de ovarios de 2-4 cm de longitud. Se utilizó como medio de cultivo la formulación de Murashige y Skoog [19], con las fuentes de nitrógeno modificadas por Robert *et al.* [5], suplementadas con sacarosa (2%, w/v), glucosa (2%, w/v), mio-inositol (100 mg/L) y diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores del crecimiento (2,4-D 0.1 - 2.0 mmol/L, BAP y Kinetina 22.2 - 88.8 mmol/L), estas combinaciones dependieron de la etapa (inducción, formación de embriones, maduración y germinación). Los medios se solidificaron con agar (10 g/L).

### Condiciones de cultivo

La composición nutricional basal que se empleó para todos los medios evaluados, fue la recomendada por Murashige y Skoog [19], con las sales portadoras de nitrógeno ligeramente modificadas por Robert *et al.* [5]. La esterilización se realizó en autoclave a una temperatura de 121 °C y 1.2 kg/cm<sup>2</sup> de presión; el tiempo de esterilización varió entre 15 y 20 min., en dependencia del volumen del medio. La solidificación de los medios de cultivo se hizo siempre con agar técnico #3. El pH se ajustó a 5.7 con HCl (0.1 N) antes de la esterilización.

Los cultivos se incubaron en cámaras de luz natural con una iluminación aproximada de 3000 lux (37.5 μmol. m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>), fotoperíodo de 16 horas luz. Además, la presencia o no de luz se estableció de acuerdo con el ensayo o propuesto. La temperatura osciló entre los 25 y 28 °C.

### Análisis estadístico

En todos los experimentos se empleó un diseño completamente aleatorizado. Para cada población de datos se analizaron que estos cumplieran la distribución normal (Kolmogorov-Smirnov) y que cumplieran con la prueba de homogeneidad de la varianza (Bartlett). Para detectar la diferencia entre las medias se realizó la prueba de Duncan al 5%. Para los análisis estadísticos se empleó el programa JMP, versión 3.1.4 del sistema SAS [20].

### Estudio de la similitud genética de descendientes clonados *in vitro*

El objetivo de este ensayo fue el de comprobar la posibilidad de detectar polimorfismo dentro de un grupo de individuos de la población propagada por la vía tradicional (13) y conocer la estabilidad genética del material vegetal clonado *in vitro* por embriogénesis somática (línea 1 y 4) y solo por la vía organogénica (línea 9) (ocho individuos por línea seleccionada). En el primer caso (población propagada por la vía tradicional, 13 individuos) se emplearon las combinaciones de primers E-ACG X M-CTC y E-ACG X M-CTG. En la comparación de la identidad planta madre/descendencia *in vitro* se usaron los juegos de primers E-ACG X M-CTC; E-ACG X M-CTG; E-ACG X M-CTA y E-ACG X M-CTT.

A partir de las autorradiografías, se inició el análisis de los datos aportados por los experimentos relacionados con el estudio molecular, donde se obtuvo una matriz de ceros y unos, asignando "1" si se trataba de

10. Groenewald EG, Wessels DCJ, Koeleman A, (1977). Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an Agave species (Agavaceae) Z. Pflanzenphysiol, 21(4): p. 369-73.
11. Hunault G, (1979). Recherches sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotyledones cultivés *in vitro*. II Etude du cas de quelques Agavacees. Rev. Cytol. Biol. veget Bot. 2: 21-66.
12. Rodríguez-Garay B, Gutierrez-Mora A, Acosta BA, (1996). Somatic embryogenesis of Agave victoriana reginue. Moore. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 4: p. 85-7
13. Orellana PP, (1998). Propagación vía organogénesis. En JN Pérez Ponce (ed) Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología: p. 151-78. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara. Cuba.
14. Yang H, Tabei Y, Kamada H, Kayamo T, Takawaiwa F, (1999). Detection of somaclonal variation in cultured rice cells using digoxigenin-based random amplified polymorphic DNA. Plant Cell Reports. 18: 520-6.
15. Lee M, (1995). DNA markers and plant breeding programs. Adv. Agron. 55: 265-344.
16. Karp A, Seberg O, Buiatti F, (1996). Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. Ann Bot., 78: 143-9.
17. Voos P, Hogers R, Bleeker M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot Peleman J, Kuiper M, Zabeu M, (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research, 23: 4407-14.
18. Powell W, Thomas WTB, Baird E, Lawrence P, Booth A, Harrower B, McNicol JM, Waugh R, (1996). Analysis of amplified fragment length polymorphism. Heredity Genome, 45: 203-7.
19. Murashige T, Skoog F, (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-97.
20. SAS. (1990). SAS/Stat User's guide, Version 6, 4<sup>th</sup> ed. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
21. Barret B, Kidwell K, (1998). AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the pacific northwest. Crop. Science, 38: 1261-71.
22. Perera L, Russell J, Provan J, McNicol J, Powell W, (1998). Evaluating genetic relationships between indigenous coconut (Cocos nucifera L) accessions from Sri Lanka by means of AFLP profiling. Theor. Appl. Genet, 96: 545-50.

la presencia de una banda, y "0" si se trataba de ausencia de una banda. Con base a varios autores [21, 22] se comenzó el análisis de los datos, calculando el porcentaje de polimorfismo encontrado a partir de todas las combinaciones de oligonucleótidos utilizadas. Este porcentaje se obtuvo a partir del número de bandas totales y el número de bandas polimórficas. Posteriormente se realizó el análisis estadístico de los datos.

Con el fin de visualizar de forma más apropiada las similitudes entre los individuos, se elaboró un dendograma, utilizando la matriz de similitud, mediante el método de agrupamiento no ponderado de pares utilizando el promedio aritmético conocido como UPGMA (del inglés unweighted pair-group method with arithmetic averaging) del programa NTSYS, versión 2.0 [23] y el sistema de programa MAT-GEN, versión 2.0 [24].

## Resultados

### Caracterización morfológica de individuos propagados por vía tradicional

El análisis de componentes principales a los 13 individuos seleccionados de la plantación propagada por la vía tradicional, permitió determinar las variables que en las dos primeras componentes explicaron el 93% de la variabilidad total. Las variables relacionadas con el rendimiento de fibra, longitud de la hoja (V1) y ancho de la hoja en la región media (V2), unido a una característica indeseable, número de espinas (V4), tuvieron la mayor contribución a la componente C1 (60%) y la variable distancia entre espinas (V5) a la componente C2 (33%), por cierto también de las clasificadas indeseables.

El gráfico de las componentes C1-C2 (Figura 1) muestra que hubo un grupo de individuos que se unieron en un bloque compacto, estos fueron el 11, 10, 12, 8, 14, 7, 13, 5 y el 2, los cuales se situaron entre los dos cuadrantes de la derecha. En la primera componente este grupo de individuos se caracterizó por presentar menor longitud de las hojas, menor ancho de las hojas en el medio y menor número de espinas. En la segunda componente este grupo se manifestó con valores intermedios en cuanto a distancia entre espinas.

Los restantes cuatro individuos se situaron en los cuadrantes de la izquierda, donde el 9 y el 3 se situaron en el cuadrante superior y el 4 y el 1 se situaron en el cuadrante inferior.

En comparación con el grupo de individuos agrupados, en la primera componente de la Figura 1 se puede observar que los individuos 9, 3, 4 y 1 aunque alejados relativamente entre ellos se caracterizaron por tener los mejores y más altos valores en longitud de las hojas (V1) y ancho de las hojas en la región media (V2), aunque presentaron el mayor número de espinas (V4), comportamiento este no deseado.

En la segunda componente, los individuos 9 y 3 cercanos relativamente se caracterizaron por tener la menor distancia entre espinas, alcanzando el 9 el menor valor, el 4 presentó valores intermedios y el de mejores resultados en este aspecto fue el 1 con la mayor distancia entre espinas (V5).

La variabilidad en la respuesta de los materiales evaluados observada en la Figura 1 de componentes principales, mostró la presencia de la variación pre-

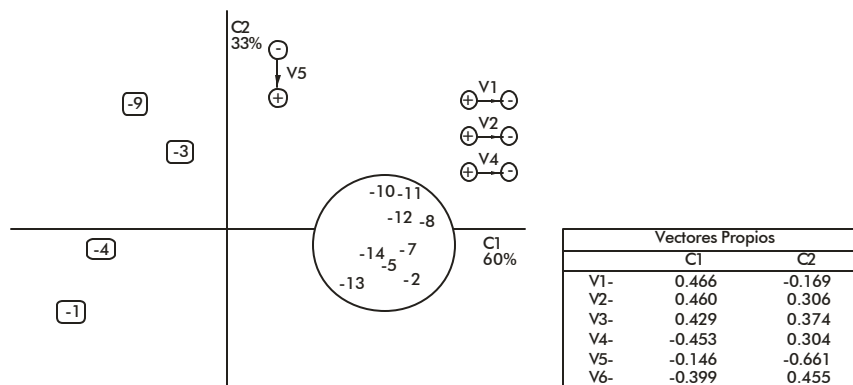


Figura 1. Distribución de los 13 individuos en estudio en los planos 1 y 2 del análisis de componentes principales.

C1, C2: Dos primeras componentes principales.

V1: Longitud de la hoja. V2: Ancho de la hoja en el medio V4: Número de espinas.

existente, dentro del grupo de los individuos seleccionados de esta especie, teniendo en cuenta la dispersión que presentaron.

De este análisis se concluye que los mejores individuos de acuerdo a los parámetros analizados para su micropropagación, son el 9, 3, 4 y 1.

En este ensayo, no se tuvo en cuenta el número de hojas como variable componente del rendimiento agrícola, debido a que la selección de los individuos se realizó en plantaciones comerciales sometidas a varios períodos de corte, lo que constató que la presencia de hojas en la planta, estuvo muy relacionada con la calidad del corte y no con la potencialidad genética de la misma para producir las hojas.

### Micropropagación

Se realizó la transferencia de la tecnología propuesta por Robert *et al.* [5] con gran éxito. En la propuesta cubana se utilizó por primera vez la luz natural lo que le permitió el normal desarrollo de todas las etapas de la micropropagación y una mayor eficiencia. Al parecer la luz natural en este cultivo permite el desarrollo de raíces y nuevas hojas con estomas normales y ceras en su cubierta, todo lo cual condujo a una aclimatación en 42 días y por lo tanto se redujeron los costos de producción. Resultados similares fueron obtenidos por Robert *et al.* [5] al trabajar con el germoplasma de Yucatán.

Además de la ventaja que proporciona la aplicación de esta tecnología para la rápida recuperación henequenera, desde el punto de vista económico, no debe dejar de mencionarse la significación que esta recuperación tiene para la conservación de nuestros recursos naturales, pues de una parte, la reincorporación del uso de la fibra natural y sus derivados contribuye a reducir los daños que se ocasionan por la utilización de elementos sintéticos y de otra, contribuye a detener el deterioro de los suelos pobres costeros o salinizados y de lugares apartados de la montaña y los cayos.

### Embriogénesis somática

Cuando se analizó la influencia de las condiciones de incubación (luz-oscuridad) para las tres fuentes de explantes, no se observaron diferencias significati-

23. Rohlf J F, (1998). NTSYS pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.0.

24. Sigarroa A, Cornide M T, (1998). MAT-GEN. Versión 2.0. Editorial CNIC.

25. Thorpe TA, (1988). *In vitro* somatic embryogenesis. ISI Atlas of science: Animal and Plant Science: p. 81-8.

vas ni en la formación de callos, ni en la presencia de agregados embriogénicos. Esto corrobora lo planteado por Thorpe [25], quien afirma que la embriogénesis somática puede ocurrir bajo diferentes regímenes de luz-oscuridad, además para algunas especies puede la oscuridad favorecer la inducción y formación de embriones [26]. Resultados diferentes fueron obtenidos por Rodríguez-Garay *et al.* [12], quienes utilizaron una intensidad luminosa muy baja para obtener embriones de *Agave victoria-reginae* Moore.

La calidad en la respuesta positiva del ápice en la obtención de callo con estructuras embriogénicas con relación a los otros explantes utilizados se debe a que es un tejido con un porcentaje muy elevado de células meristemáticas, a partir de las cuales por la acción de una auxina que media la transición de célula somática a célula embriogénica [27], se producen los centros meristemáticos que son zonas de acelerada división y crecimiento, de los cuales se desprenden células que inician divisiones polares y asimétricas, convirtiéndose de esta forma en células preembriogénicas a partir de las cuales se forman los embriones. Por lo tanto, un tejido con la presencia mayoritaria de otros tipos de células más diferenciadas en henequén, presentará una calidad reducida para iniciar el proceso embriogénico bajo las condiciones aquí establecidas.

En la Figura 2 se reconocen todas las partes integrantes del embrión: la radícula, el escutelum (cotiledón) de forma alargada, el coleóptilo situado a un lado protegiendo la plúmula lo cual indica la obtención de un embrión característico de monocotiledóneas.

En la última fase (germinación) los embriones somáticos formados se desprendían fácilmente, dando origen al vástago y la radícula, resultados que coinciden con los alcanzados por Gómez [28], en *Xanthosoma sagittifolium* L.

Aunque se logró éxito en la germinación (Figura 3) de los embriones, sólo en la concentración de 22.2  $\mu\text{mol/L}$  de 6BAP combinada con 2.4-D se alcanzó el 62% de las plantas regeneradas con hojas y raíces, en las demás concentraciones no rebasó el 20% de plantas completas. A pesar de esto se debe tener en cuenta lo planteado por Fujii *et al.* [29],

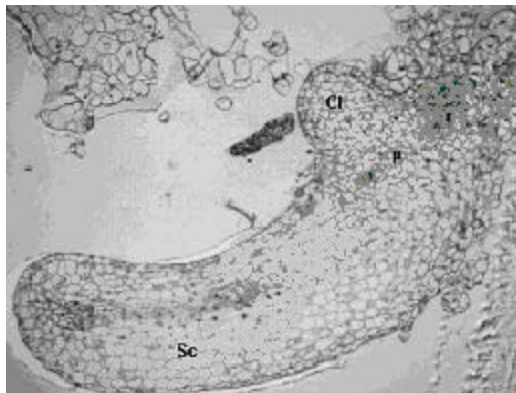


Figura 2. Corte longitudinal de un embrión de henequén. Sc(escutelum), Cl(coleóptilo), p(plúmula), r(radícula). Desarrollo de un embrión característico para monocotiledóneas.

quienes dijeron que la habilidad de obtener *in vitro* plantas con raíces no es necesariamente un indicador de continuo crecimiento y vigor en condiciones *ex vitro*, lo que sugiere que no es determinante la presencia de raíces para corroborar la eficiencia de la germinación de embriones.

### Estudio de la similitud genética de descendientes clonados *in vitro*

La alta reproducibilidad, la rápida generación y la presencia de bandas polimórficas en henequén, generadas en este ensayo, hacen del análisis de ADN por AFLP, una técnica atractiva para la identificación de polimorfismos. Este resultado exitoso se suma a los alcanzados en la determinación de la diversidad de los germoplasmas de soja [30], arroz [31], té [32] y trigo [21], empleando los marcadores AFLP.

Se demostró que el ADN de henequén, se amplificó selectivamente por RCP con el uso de las diferentes combinaciones de primers, lo que indicó lo satisfactorio del método de extracción de ADN empleado, según la propuesta de Keb *et al.* [33]. En este resultado se corrobora lo planteado por Lin y Kuo [34], que la alta calidad del ADN genómico fue necesario para obtener adecuados patrones AFLP, pues por el contrario se producen digestiones incompletas y como consecuencia patrones inconsistentes.

El dendrograma del análisis de agrupamiento UPGMA [23], de similitud genética basado en las bandas de AFLP obtenidas con las 4 combinaciones de primers (E-ACG X M-CTG; E-ACG X M-CTA; E-ACG X M-CTT; E-ACG X M-CTC) aparece en la Figura 4.

Los resultados muestran la aparición de 3 grandes grupos que comprenden perfectamente a la madre y sus descendientes en un bloque muy unidos, lo que corrobora la alta similitud de la descendencia a sus progenitores, demostrándose que con este grupo de plantas estudiadas, se alcanzó un alto grado de estabilidad genética, tanto con la embriogénesis somática (L1, L4) como con la organogénesis (L9), además, se confirmó la variabilidad detectada en la población propagada por la vía tradicional, al separarse los individuos en tres grupos bien distinguibles.

Aunque la población que se estudió es pequeña, se detectó mayor variabilidad en las plantas propagadas por la vía tradicional, ello pudiera estar dado, porque el henequén se introdujo en Cuba desde 1850 y desde ese momento hasta la fecha actual, se ha propagado continuamente, sin un programa mantenido de mejo-

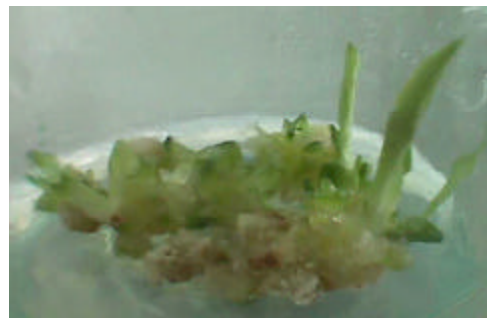


Figura 3. Germinación de embriones de henequén

26. Jiménez E, (1995). Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (*Saccharum spp.* híbrido). Tesis para optar al grado de Doctor de Ciencias Agrícolas, UCLV. Fac de Agronomía, I.B.P Cuba. p. 93.

27. Dodeman VL, Duereux G, Kreis M, (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*. 48 (313): p. 1493-509.

28. Gómez R, (1992). Medios de cultivo in primer curso FAO-Francia-Cuba sobre técnicas modernas, mejoramiento y multiplicación de especies agámicas. IBP. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba: p. 196.

29. Fujii J, Stade D, Olsen R, Ruzin SY, Redenbaugh K, (1990). Alfalfa somatic embryo maturation and conversion to plants. *Plant Sci*. 72:93-100.

30. Maughan PJ, Saghai MA, Buss GR, Huestis GM, (1996). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet*. 93:392-401.

31. Mackill DJ, Zhang Z, Redoña ED, Colowit PM, (1996). Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genoma* 39:969-77.

32. Paul S, Washira FN, Powell W, Waugh R, (1997). Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Keyan tea (*Camellia sinensis* L. Okuntze) revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet*. 94:225-63.

33. Keb Llanes Miguel, González Gerardo, Chi Manzanero Bartolome, Infante Diogenes, (2002). A rapid and simple method for small-scale DNA. Extraction agavaceae and others tropical plant. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20: 1-5, September.

34. Lin JJ, Kuo J, (1996). AFLP A novel PCR-Based Assay for plant and Bacterial DNA Fingerprinting. *Focus* 17 (2): 66-70.

ramiento, a pesar, de establecerse en condiciones altamente estresantes, lo que lo ha obligado a adaptarse a estas condiciones para poder sobrevivir y ello posiblemente se haya convertido, en una de las fuentes generadoras de variación.

Con este sistema de regeneración por vía embriogénica en medio semisólido se producen en 315 días aproximadamente 6000 plantas, a partir de un ápice. Las vitroplantas se aclimatizan durante 42 días con una supervivencia del 85%, concluida esta etapa se genera por planta un costo de 11.27 centavos.

Las plantas aclimatizadas se llevan a un microvivero durante 5 meses hasta alcanzar una talla entre 12 y 15 cm, lo que le permite estar apta para la etapa de vivero, en la cual se mantienen durante 10 meses, hasta alcanzar la altura adecuada, para que se lleven a plantación comercial con 40 a 45 cm de altura.

Las plantas producidas *in vitro* fueron más homogéneas en todos sus aspectos morfológicos y fisiológicos, que las plantas generadas en campo, lo que contribuyó a que las primeras lograran una sincronización del crecimiento tal que casi más del 90% de éstas llegaron a la etapa de su ciclo de producción al mismo tiempo, contrario sucedió con las segundas donde menos del 40% llegó a esta etapa. Este resultado evidencia la superioridad de las vitroplantas, pues debido a su mayor velocidad de crecimiento alcanzan la altura mínima requerida para la cosecha de las hojas a los tres años y 4 meses, en vez de a los 5 ó 6 que requieren las plantas propagadas por la vía tradicional.

Es importante señalar que estos resultados aunque basados en datos de campo tienen un cierto grado especulativo en lo concerniente a la mayor productividad de la vitroplantas, pues hay poco conocimiento genético del henequén, fundamentalmente en lo que se refiere a la heredabilidad de sus caracteres y al grado de variabilidad de las plantaciones cubanas. Por ejemplo, se sugiere que la planta produce un número predeterminado de hojas a lo largo de su ciclo de vida [35], independiente de su

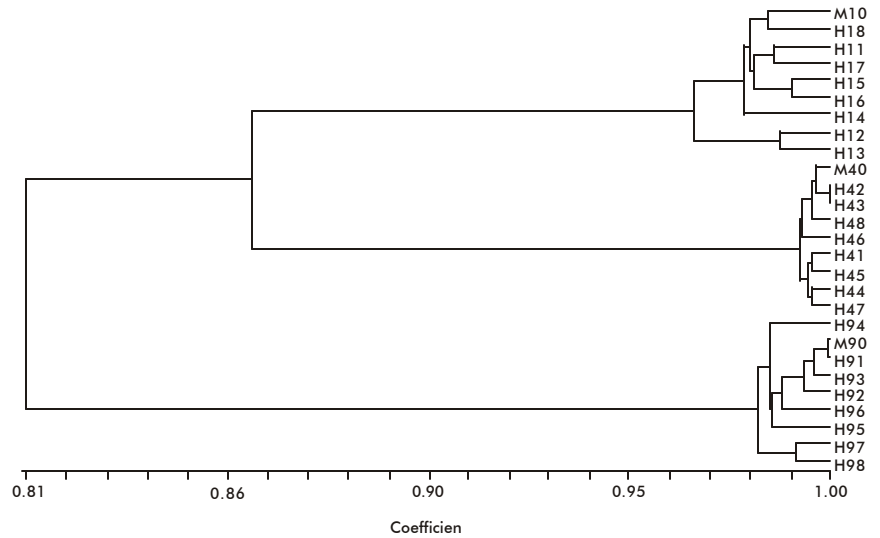


Figura 4. Dendrograma del análisis de agrupamiento UPGMA que representa la similitud entre tres grupos de individuos propagados *in vitro*. Las letras M corresponden a la planta donadora de cada línea y las letras H representan la descendencia de cada planta donante.

duración. Si así fuera, las vitroplantas de las líneas clonales producen el mismo número de hojas que las plantas de campo pero en un tiempo más corto de vida. Ello por lo tanto limitaría el potencial de mejoramiento productivo del henequén; sin embargo, no existe información concluyente al respecto, lo que es muy poco probable que se trate de una característica genética absolutamente homogénea para toda la especie, por lo que deben existir y así lo indican estos resultados, individuos que produzcan más hojas que otros o que alcancen tallas mayores.

### Agradecimientos

A la Universidad de las Naciones Unidas (UNU) y al Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán que apoyaron financieramente parte de este trabajo.

35. Carrión M, 1988. El henequén como planta productora de fibras duras. Bole-  
tín 15:7-29.