

## Tecnología para la micropropagación de henequén a gran escala.

Esperanza Peña García\*, Gerardo González Oramas\*\*, Ana Berrillo Caisés\*\*\*, Daynét Sosa del Castillo\*\*, Marta Arteaga Amador\*, Leticia Fuentes\*\*, Daniel Rittoles\*\*\*\*, Dalia Pérez Montesinos\* y Zoraida Torriente Campos\*

\* Jardín Botánico Nacional de Cuba, Universidad de la Habana; \*\* Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas; \*\*\* Delegación Territorial del MINAGRI, Holguín; \*\*\*\* Grupo de Henequén y sus Derivados.

### RESUMEN

La demanda de posturas homogéneas y de alta calidad para la reposición y desarrollo de nuevas áreas cultivadas, a bajo costo y en corto tiempo, sólo es posible utilizando biotecnologías.

Se realizó la evaluación previa a escala de laboratorio acerca de los caracteres requeridos en las plantas donadoras de hijos basales, fuentes de explanto y explantos, esquemas de desinfección, medios nutritivos y balances hormonales requeridos para la iniciación y fases posteriores *in vitro*, requerimientos de iluminación, frascos de cultivo y composición del sustrato para obtener vitroplantas vigorosas con la talla requerida para su cultivo en vivero.

Los mejores resultados se utilizaron para elaborar, ejecutar y demostrar la factibilidad de la propuesta tecnológica para una producción de vitroplantas de henequén a gran escala en Cuba.

Se demuestra la validez de la propuesta y las ventajas de su aplicación. Se discuten los resultados.

### ABSTRACT

Needs of homogeneous and high quality juvenile plants of henequen for reposition and development of new cultivated areas with low costs and in a short period of time is only possible using biotechnologies.

Features required in basal shoots of donor plants, explant source and explants, desinfection schemes, nutritive media and hormonal balances needed for shoot initiation and subsequent *in vitro* phases, light requirements, culture vessels and substrate composition were evaluated at a previously developed laboratory scale in order to obtain vigorous vitroplants with the required length for nursery culture.

The best results were used to elaborate, execute and prove the factibility of the technological proposal for a large scale production of henequen vitroplants in Cuba.

The vally of the proposal is demonstrated in addition to the advantages of its application. Results are discussed.

### INTRODUCCION

El henequén ha constituido la fuente de mayor importancia en el mundo para la obtención de fibras naturales, a lo que se añaden hoy las potencialidades del jugo, la fibrilla y la pulpa. Aún después de la utilización preferente de la fibra sintética, la industria henequenera constituye una alternativa importante para el aprovechamiento de grandes extensiones de tierra en las que no pueden cultivarse otras especies de interés económico y para la obtención de materia prima de gran utilidad comercial.

De origen yucateco, el henequén (*Agave fourcroydes* Lem) fue introducido en Cuba a mediados del pasado siglo. Su explotación es tradicional en el país y su cultivo se extendió en zonas próximas a la costa y en llanuras de suelos pobres, calcáreos y porosos no aprovechables para el desarrollo de otros objetivos agrícolas. A pesar de que a poco más de un siglo después de su introducción fuera marginado por el desarrollo acelerado de áreas con objetivos económicos de mayor prioridad, aún existen plantaciones de henequén de altos rendimientos en fibra de gran calidad, así como plantas desfibradoras y capacidad industrial instalada

para el procesamiento de la fibra y la producción de sogas, jarcias, cordeles e hilos para engavillar.

Evaluada la posibilidad actual de dar al henequén un uso integral por el aprovechamiento adicional del jugo, la pulpa y la fibrilla en la obtención, de abonos, detergentes y precursores de medicamentos, entre otros, a principios de la década de los años noventa se reinician trabajos para lograr la recuperación henequenera a través de la restauración de las áreas tradicionalmente cultivadas y del fomento de nuevas plantaciones. Sin embargo, la cosecha y plantación de la cantidad de posturas de alta calidad requeridas para lograr avances productivos a corto plazo, no era factible utilizando sólo las vías de propagación y las técnicas de cultivo aplicadas tradicionalmente. De ahí la importancia de lograr tecnologías que puedan aplicarse a gran escala, con germoplasma seleccionado y que resultan económicamente atractivas.

La aplicación de cultivo *in vitro* a los agaves se inició en la década de los años setenta (Murashige, 1974;

Groenewald *et al.*, 1977; Hunault, 1979). Después de quince años de investigaciones que abarcaron, además de la micropropagación, intentos para inducir la variabilidad genética con mayor eficacia por la reducción del riesgo en la producción de quimeras *in vitro* (Frydrych, 1982), se estableció un protocolo general para la micropropagación de *Agavaceae* (Madrigal *et al.*, 1989) a partir de la experiencia acumulada en dieciocho especies del grupo, aunque se excluyeron aspectos de importancia ya publicados (Robert *et al.*, 1987).

A partir de la publicación del esquema general para la micropropagación de *Agavaceae* se hicieron diferentes trabajos que refieren los resultados de micropropagar especies de la familia.

Se logra la regeneración de plantas de *Agave arizonica* (Power y Backhaus, 1989) a partir de los callos procedentes de segmentos basales de los bulbillos utilizando un procedimiento similar al descrito en henequén (Robert *et al.*, 1987); se aplicó la micropropagación a *Polyanthes tuberosa* (Shen *et al.*, 1991) utilizando fragmentos de escama del bulbo, yemas y escapos florales a fin de determinar la concentración óptima de sacarosa para la producción de brotes y la eficacia de aplicar pretratamientos a los brotes obtenidos para su enraizamiento; se utilizan los pequeños nódulos verdes que se forman en los fragmentos del rizoma de **Agave sisalana** como fuente para multiplicar las yemas caulinares directamente y la posibilidad de eliminar la fase de enraizamiento *in vitro* (Das, 1992); y se inicia una etapa con los objetivos de elevar los rendimientos de la micropropagación y la producción de metabolitos secundarios.

La micropropagación del henequén se logró exitosamente (Cruz Ramos *et al.*, 1985; Robert *et al.*, 1987) y se ha podido evaluar la relación existente entre el potencial hídrico del medio de cultivo, las enzimas que intervienen en la asimilación del nitrógeno y la vitrificación que tanto influye en los rendimientos de una tecnología por su influencia en los porcentajes de supervivencia de las vitroplantas (Castro *et al.*, 1989). Los avances obtenidos en la micropropagación del henequén se reflejan en la propuesta tecnológica para su micropropagación (Robert *et al.*, 1992) en la que se ofrece una información detallada de la fuente de explanto y procedimiento para su desinfección; se detallan medios nutritivos, suplementos hormonales, agentes gelificantes y condiciones de cultivo para cada una de las fases hasta obtener brotes maduros; se especifican las condiciones para la aclimatización con resultados de supervivencia elevados; y se presenta un esquema para su ejecución.

Aunque el procedimiento descrito (Robert *et al.*, 1992) proporciona un elevado número de plantas y asegura la estabilidad genética, los propios autores advierten la necesidad de ajustar la propuesta si se pretende hacer

una propagación a gran escala. No obstante sus ventajas, la tecnología yucateca incluye la utilización de un conjunto de factores que elevan sensiblemente los costos en la producción de vitroplantas de cualquier cultivo y que están relacionadas a las condiciones artificiales que se aplican al sistema.

En el presente trabajo se reporta una tecnología para la producción de vitroplantas de henequén de alta calidad a bajo costo y que proporciona ventajas tecnológicas, constructivas, económicas y sociales.

## MATERIALES Y METODOS

### Criterios para la selección del germoplasma

Dada la inexistencia actual de un banco de germoplasma establecido, que constituye la fuente idónea para extraer el material por estar completamente caracterizado y controlado; sometido a una atención cultural permanente que garantice su estado fitosanitario óptimo; cultivado con un régimen de corte de hojas que asegure un ciclo de vida largo; mantenido con un régimen nutricional que posibilite la expresión de la potencialidad real de cada espécimen; y donde se controlen caracteres de interés que permitan la selección de las plantas donadoras de fuentes de explantos y explantos de alta calidad, se utilizaron especímenes aislados dentro de campos de ocho a diez años.

Cada uno de los 50 ejemplares seleccionados fue marcado, completamente caracterizado y considerado como un clon (Fig. 1).



Figura 1. Selección de ejemplares élite y trabajo de caracterización.

Para la elección de los especímenes se tuvieron en cuenta: su estado fitosanitario, la longitud y el diámetro del fuste, la longitud y número de hojas y el número de hijos, que constituyen indicadores de la robustez de la planta.

A partir del germoplasma seleccionado, identificado y localizado, se obtuvieron las distintas fuentes de explanto a evaluar.

**Selección de fuentes de explantos, explantos, esquemas de desinfección, medios nutritivos y condiciones de cultivo.**

Para la selección de las fuentes de explanto se consideraron los resultados obtenidos en una fase de laboratorio a pequeña escala realizada previamente (Tabla I).

**Tabla I.**  
Evaluación de fuentes de explanto para su utilización en la micropropagación de henequén a gran escala.

FUENTES DE EXPLANTO	RESPUESTA	CONTAMINACION	RENDIMIENTO
<b>YEMAS</b>			
1. AÉREAS DEL TALLO	SI	NO PERMISIBLE	NULO
2. SUBTERRÁNEAS	SI	NO PERMISIBLE	NULO
3. AÉREAS DE LA INFLORESCENCIA	SI	NO PERMISIBLE	NULO
<b>BULBILLOS</b>			
4. PRODUCIDOS EN ETAPA POSFLORAL	SI	< 5%	ELEVADO
5. PRODUCIDOS EN VARETA CORTADA	SI	< 5%	ELEVADO
<b>PEDÚNCULOS FLORALES</b>			
6. ETAPA PREFLORAL	NO	NO PERMISIBLE	NULO
7. DURANTE LA FLORACIÓN	NO	NO PERMISIBLE	NULO
8. ETAPA POSFLORAL	SI	NO PERMISIBLE	ELEVADO
<b>COGOLLO</b>			
9. PLANTAS JÓVENES DE DOS AÑOS	SI	< 5%	ELEVADO

Entre las tres fuentes de explanto que produjeron respuestas con elevados rendimientos en la producción de brotes y con porcentajes de contaminación inferiores al 5%, se seleccionó el cogollo de las plantas jóvenes de dos años para la producción de vitroplantas a gran escala. Esta fuente tiene ventajas sobre los bulbillos porque puede obtenerse en cualquier momento del año, durante gran parte del ciclo de vida de la planta y su extracción no causa daños a la plantación ni se opone a las normas establecidas para el cultivo (corte de vareta para evitar manchas en la fibra por secreciones florales).

La extracción de los explantos se realizó siguiendo lo referido antes (Robert et al., 1992) hasta la obtención del fragmento cúbico de 5 - 6 cm de lado, el que se procesó siguiendo la secuencia de pasos que se detallan (Tabla II), por ser el procedimiento de mejores resultados durante la fase previa de laboratorio.

La elección del medio de cultivo para promover la iniciación (MSI) se realizó considerando los resultados obtenidos durante la fase de laboratorio (Tabla III). De entre los medios nutritivos que indujeron brotación, se seleccionó el que se compone de las sales inorgánicas del medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 mg/L de azúcar refinado, 0,025 mg/L de 2,4-D, 10 mg/L de BAP, y el complejo vitamínico propuesto con anterioridad (Robert et al., 1992): 2 mg/L de glicina, 0,5 mg/L de ácido nicotínico, 0,5 mg/L de piridoxina, 0,1 mg/L de tiamina y 100 mg/L de inositol, que se solidificó con 10 gr/L de agar (OXOID No. 3) en polvo. La composición de los medios nutritivos para lograr el crecimiento de explantos (MSC), la multiplicación de brotes (MSMu) y su maduración (MSMa) posterior para la aclimatización en condiciones de umbráculo tuvieron la misma composición básica salvo los suplementos hormonales que se aplicaron según la respuesta a promover. En el medio de crecimiento se redujo la con-

centración de BAP a un mg/L; para lograr la multiplicación se aplicaron las mismas concentraciones de 2,4-D y BAP que durante la iniciación; y durante la fase de maduración, se restituyeron las concentraciones apli-

cadas para el crecimiento de los brotes, sólo que la concentración de azúcar se redujo a 20 gr/L y la de agar se incrementó a 11 gr/L.

Tabla II.

Procedimiento para la desinfección y obtención de explantos axénicos del tejido del cogollo de plantas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) para su iniciación in vitro.

1. Sumergir el bloque de tejido en lejía comercial Kinsol (2,5% cloro activo) al 20% un tiempo máximo de 30' al tiempo que se procesan otros cogollos.
2. Realizar 3 lavados sucesivos con agua destilada durante 5' cada uno.
3. Sumergir en lejía comercial Kinsol (2,5% cloro activo) al 20% y transportar el recipiente tapado a la cámara de flujo laminar.
4. Realizar de inmediato 3 lavados sucesivos con agua destilada estéril durante 5' cada uno.
5. Sumergir en lejía comercial Kinsol (2,5% cloro activo) al 80% durante 30'
6. Lavar 3 veces con agua destilada estéril y colocar el bloque sobre papel de filtro estéril para secarlo.
7. Descartar la superficie del material afectado por el tratamiento con Kinsol.
8. Cortar bloques cúbicos de 0,8 cm de lado (explantos).
9. Inocular los explantos en medio sólido de pretratamiento con 30 gr/L de azúcar refinado y 50 mg/L de tetraciclina.
10. Mantener en la cámara de crecimiento a 28°C y ausencia de luz durante 5 a 7 días.
11. Transferir los explantos axénicos al medio de iniciación a razón de 5 explantos por frasco.

Tabla III.

Evaluación del efecto de distintos medios de cultivo y suplementos para la iniciación de brotes de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) a gran escala

COMPOSICION DE SALES INORGANICAS	FUENTES DE CARBONO	FACTORES DE CRECIMIENTO HORMONAS	VITAMINAS	COMPLEJOS NATURALES
MS	Azúcar refinado	ANA / BAP	I - T	-
MS	Azúcar refinado	ANA / BAP	I - T - N - P - G	Hidrolizado de caseína
MS	Azúcar refinado	-	I	Agua de coco *
MS	Azúcar refinado	BAP	I	Agua de coco *
MS	Azúcar refinado	-	I	Jugo de henequén
MS	Azúcar refinado	-	I	Extracto de plátano
MS	Azúcar refinado	2,4D / BAP	I - T - N - P - G	- *
MS	Azúcar pastelera	2,4D / BAP	I - T - N - P - G	- *
KNUDSON	Azúcar refinado	-	I	Agua de coco *
KNUDSON	Azúcar refinado	-	I	Extracto de plátano
KNUDSON	Azúcar refinado	-	I	Jugo de henequén
KNOP	Azúcar refinado	-	I	Agua de coco
KNOP	Azúcar refinado	-	I	Extracto de plátano
KNOP	Azúcar refinado	-	I	Jugo de henequén

(\*) Medios que promueven brotación en las fuentes de explanto referidas en la tabla II.

I, Inositol; T, Tiamina; N, Acido Nicotínico; P, Piridoxina; G, Glicina.

Los explantos y brotes se cultivan en frascos de vidrio de 250 ml de capacidad con tapa de media rosca y sellados con envoltura autoadherente Kleen Pack. En éstos, se adicionan 40 ml del medio nutritivo que proporcionó los mejores resultados en la fase de laboratorio para un tiempo no mayor de cinco semanas. La cantidad de material vegetal por frasco se varió según

la fase del protocolo aplicado; durante la iniciación se inocularon cinco explantos por frasco y en las fases siguientes, se cultivaron 10 brotes por frasco. Se realizaron subcultivos a medio fresco cada cuatro semanas a menos que debiera reducirse el tiempo por cambio de fase del protocolo.

Todos los cultivos se mantuvieron en condiciones de iluminación natural a excepción de la fase de iniciación que requiere de iluminación continua. Para ello se utilizó la luz natural de día, complementada por luz artificial de noche, con intensidad de 3000-5000 lux (56-80 microE/m<sup>2</sup>/seg), recomendada anteriormente para la iniciación en condiciones artificiales (Robert et al., 1992). La temperatura se mantuvo controlada en 27±2°C.

**Criterios para el paso a las distintas fases del protocolo de micropropagación**

Los explantos axénicos cultivados durante cinco días en el medio de pretratamiento con tetraciclina se transfieren al medio de iniciación (MSI) bajo las condiciones de cultivo descritas.

Cada cuatro semanas, sólo los brotes o grupos de brotes diferenciados que se desprenden fácilmente del explanto original se pasan a medio de crecimiento (MSC) mientras que el bloque de tejido original se subcultiva en medio de iniciación hasta que se agota su potencial de diferenciación.

Los brotes diferenciados se mantienen en el medio de crecimiento hasta que alcanzan tallas de 4-6 cm y pueden transferirse al medio de multiplicación (MSMu) para lograr ahijamiento o al medio de maduración durante un periodo de 2-3 semanas para lograr un buen porcentaje de supervivencia durante la fase de aclimatización debido a la producción de ceras y el desarrollo de estomas (Robert et al., 1992). Los brotes crecidos *in vitro* se cultivan una sola vez en medio de multiplicación con el objetivo de impedir la vitrificación del material, después de lo cual siempre se transplantan al medio de maduración (MSMa). Para la multiplicación de los brotes, además de eliminar cualquier porción de tejido necrosado, deben desprenderse cuidadosamente dos o tres de las hojas externas y las raíces producidas durante la fase de ceniciento.

**Tratamiento a los brotes para su desarrollo en sustrato, condiciones para la aclimatización y composición del sustrato**

Una vez madurados los brotes, se extraen cuidadosamente de los frascos de cultivo y se lavan con abundante agua corriente, cuidando de no dañarlos, a la vez de eliminar todo el agar. Se podan las raicillas desarrolladas durante la maduración y los brotes se colocan sobre papel absorbente humedecido hasta que se plantan, siempre antes de las 24h.

Los brotes se plantaron dentro de un umbráculo en bandejas de poliespuma con sustrato. Se aplicó luz natural filtrada al 40% y aireación sin viento al local. En estas condiciones se mantuvieron durante 3 semanas con riego por microjets, según pudo establecerse durante la fase previa a escala de laboratorio.

Como sustrato para la aclimatización se utilizó una mezcla de pulpa de henequén fermentada durante 40 días, seca, triturada y tamizada; arena de mar lavada; y tierra de la localidad, también tamizadas, en iguales proporciones.

**Transplante de posturas y condiciones de crecimiento en túnel**

Las vitroplantas aclimatizadas se trasladaron para su crecimiento en túnel y permanecieron en las bandejas originales o se trasplantaron a canteros con una mezcla de suelo ferralítico rojo y bagazo de henequén fermentado en proporción 3:1, elevando la incidencia de luz filtrada al 60% y aplicando uno o dos riegos diarios hasta alcanzar una talla de 12 cm.

**Propuesta de esquema para la producción de vitroplantas de henequén**

Con los resultados obtenidos durante la fase experimental previa a escala de laboratorio se elaboró un esquema general para la producción masiva de vitroplantas de henequén a partir del cual se evaluarán el tiempo para la obtención de respuestas y los rendimientos (Fig. 2).

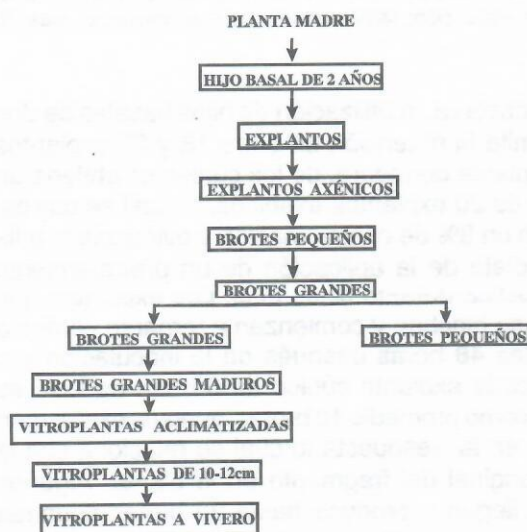
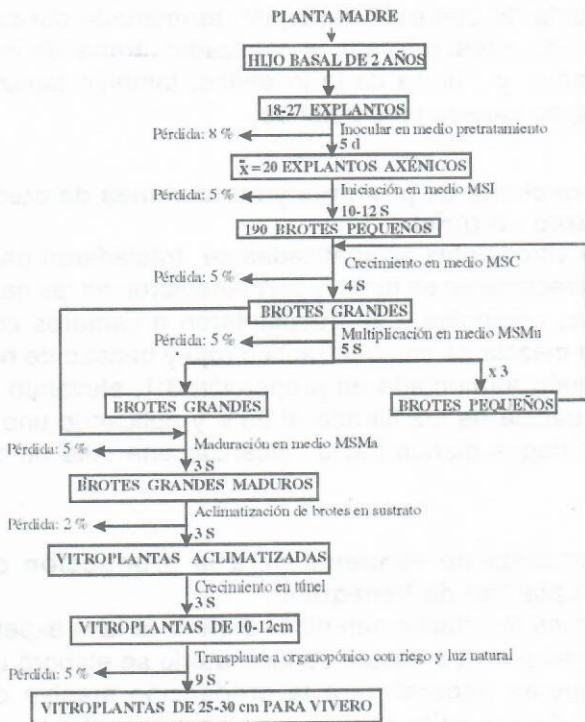


Fig. 2. Propuesta de esquema para la producción de vitroplantas de henequén a gran escala.

**RESULTADOS Y DISCUSION**

La aplicación de los resultados de micropropagación de henequén a escala de laboratorio según el esquema de producción propuesto para la propagación a gran escala permitió obtener precisiones cuantitativas y cualitativas del proceso después de validarlo con más de 2000 explantos (Fig. 3).



**Fig.3.** Esquema para la producción de vitropplantas de henequén en biofábricas. MSI, medio de iniciación; MSC, medio de crecimiento; MSMu, medio de multiplicación; MSMa, medio de maduración; d, días; S, semanas.

Como se observa, la utilización de hijos basales de dos años permite la obtención de entre 18 y 27 explantos por cada planta donadora, de los cuales se obtiene un promedio de 20 explantos axénicos, lo cual se corresponde con un 8% de contaminación y evidencia la utilidad inmediata de la aplicación de un pretratamiento con tetraciclina durante cinco días. Los explantos que se inician se hinchan y comienzan a tornarse verdes a partir de las 48 horas después de la inoculación y a partir de cada explanto cúbico de 0.8 cm de lado se producen como promedio 10 brotes, aunque existe gran variación en la respuesta lo cual se relaciona con la posición original del fragmento en la planta. Algunos explantos llegan a producir hasta 26 brotes mientras que otros pocos producen entre 0 y 3. El período de brotación comienza a partir de las 3 semanas después de la inoculación cuando la luz continua aplicada se compone de la combinación de luz natural con artificial alternadas (día/noche), con lo cual el inicio del proceso

se reduce a la mitad respecto a lo reportado con anterioridad (Robert et al., 1992) aunque puede extenderse hasta las 12 semanas, lográndose un promedio de 190 brotes pequeños entre 1-3 cm de longitud.

Los brotes de 2,5-3,0 cm de longitud que se han ido separando espontáneamente y los restos del explanto original con los últimos pequeños brotes diferenciados, una vez agotada la potencialidad de regeneración, se subcultivan en condiciones de fotoperíodo, utilizando la luz natural incidente y el medio de crecimiento (MSC) referido. Estos brotes son capaces de crecer hasta alcanzar una longitud de 4-6 cm en cuatro semanas y se desarrollan normalmente, con lo cual se demuestra que la utilización de la luz natural reduce a cero la formación de estructuras aberradas (fenómeno de vitrificación) aún cuando se utiliza el azúcar refinado de producción nacional en lugar de la sacarosa. El tipo de frasco para el cultivo utilizado en las biofábricas cubanas, con 40 ml de medio nutritivo, no introdujo variación alguna respecto a los resultados obtenidos en la fase de laboratorio realizada previamente cuando se cultivan entre 10 y 12 brotes por frasco.

Los brotes obtenidos pueden ser transferidos al medio de maduración (MSMa) para ser posteriormente aclimatizados, o pueden pasarse al medio de multiplicación (MSMu) a fin de incrementar el número de vitropplantas según se requiera.

Al realizar la fase de multiplicación, se pudo determinar que en un período de cinco semanas pueden producirse, como promedio, tres pequeños brotes por cada brote inoculado si se mantienen en las condiciones de luz y temperatura aplicadas durante la fase anterior. Es importante señalar que la fase de multiplicación debe aplicarse tal como se representa en la figura 3, donde cada brote crecido se somete al ahijamiento UNA SOLA VEZ, y son sus hijos los que después de nueve semanas están multiplicando al material. Este procedimiento también contribuye a evitar la formación de plantas vitrificadas que se reportan en otras tecnologías (Robert et al., 1992).

Como se ha referido antes (Robert et al., 1992) el cultivo de los brotes en el medio para su maduración contribuye a la inhibición de la elongación de éstos al tiempo que se desarrolla una coloración verde intensa en los mismos. Transcurridas entre dos y tres semanas en el medio de maduración y en las condiciones de cultivo descritas en las fases de crecimiento y multiplicación; y utilizando el mismo tipo de frasco, cantidad de medio nutritivo, y número de plantas por frasco ya referidas, se logran brotes capaces de pasar a la fase de aclimatización, sin que éstos tengan que subcultivarse para lograr su enraizamiento. También debe señalarse que los brotes que se transfieren a medio de maduración, aún después de aislar los hijos producidos en esa

fase, generalmente muestran ahijamiento adicional, posiblemente inducido en la etapa anterior y pueden pasarse a una fase de crecimiento, si se desea aprovechar todo el potencial.

La fase de maduración se ha realizado según se reportó antes (Robert *et al.*, 1992) aún cuando las condiciones aplicadas a los brotes sean diferentes. Sería de importancia evaluar la necesidad de la fase de maduración cuando se aplica la luz natural en las cámaras de cultivo, ya que posiblemente la utilización de la luz natural durante el proceso de desarrollo *in vitro* de los brotes favorece la formación de ceras epicuticulares y atenúa los efectos producidos por las condiciones de aclimatación *in vivo*.

Debido a las diferencias que se producen en los porcentajes de supervivencia de los brotes que enraízan *in vitro* respecto a los que enraízan *in vivo* durante la adaptación en sustrato, existen discrepancias en cuanto a la necesidad o no de aplicar la fase de enraizamiento como parte del protocolo general de micropropagación. Las condiciones en que se realiza el desarrollo *in vitro* en la tecnología establecida, unidas a las características adaptativas de la planta nos ha permitido desechar la fase de enraizamiento *in vitro* que se aplica en otras tecnologías (Madrigal *et al.*, 1989; Robert *et al.*, 1992) Algunos autores han realizado trabajos para incrementar los rendimientos en la fase de aclimatación (Herrera *et al.*, 1991). En el presente estudio se ha podido corroborar que para lograr una elevada supervivencia de los brotes es necesario tener en cuenta varios factores tales como su pretratamiento para el desarrollo en el sustrato, las condiciones en que se realice la aclimatación y las características del sustrato que se utilice. Las condiciones de aclimatación descritas permiten obtener un enraizamiento y desarrollo general de las vitroplantas, que sobreviven en más del 90% y que alcanzan una talla de hasta 10 cm.

Después de su permanencia en el local de aclimatación u otro diferente por un periodo de tres semanas más, las vitroplantas pueden someterse a condiciones de mayor iluminación (hasta el 60%) con uno o dos riegos diarios con microjet, en el mismo sustrato y recipientes en que se ha realizado la aclimatación. Esto proporciona una adaptación a las condiciones que se impondrán en la fase siguiente.

Durante esta fase de crecimiento en túnel se incrementa el número de raíces y su crecimiento. Puede producirse un incremento en talla hasta los 12 cm sin que se produzcan pérdidas.

Las vitroplantas cultivadas en bandejas (Fig. 4) se trasplantan a condiciones de organopónico a pleno sol con riego diario y con un marco de siembra de

10x10 cm, donde alcanzan la talla para vivero (25-30 cm) en 9 semanas. En este tiempo pueden ocurrir pérdidas de hasta un 5% por trasplante y traslado del material (Fig. 5).



Fig. 4. Vitroplantas aclimatizadas. Las vitroplantas se mantuvieron durante tres semanas en bandejas de poliestireno con un sustrato compuesto de pulpa de henequén: arena de mar lavada: tierra de la localidad, todas tamizadas y en proporciones 1:1:1; con dos riegos diarios con microjet, 40% de la luz natural incidente y en local aireado sin viento.

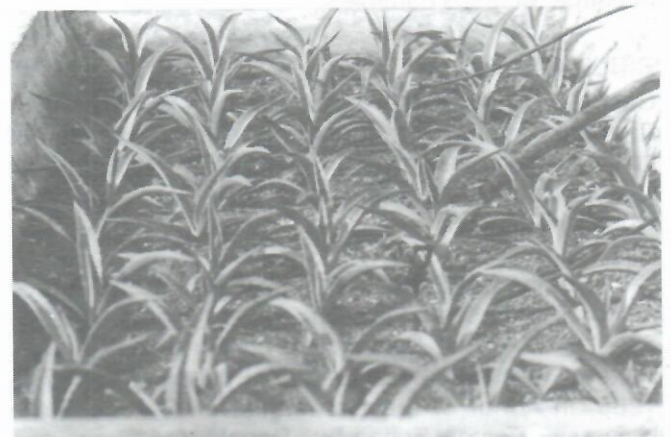


Fig. 5. Vitroplantas trasplantadas a cultivo "organopónico" con marco de siembra de 10x10 cm un riego diario por microjet, iluminación natural incidente (100%) y sustrato compuesto de suelo ferralítico rojo: bagazo de henequén (3:1).

El trabajo desarrollado tiene un conjunto de ventajas técnicas. De una parte, la tecnología que se presenta constituye una alternativa real en el presente para la obtención rápida de la cantidad de posturas requeridas, que demandan la reposición y el desarrollo henequenero previsto para los próximos años.

De otra parte, una adecuada selección de plantas madres para su multiplicación masiva, permitirá en breve, optimizar el rendimiento de las áreas destinadas al cultivo, aún cuando no se hayan desarrollado trabajos de mejoramiento genético.

Por otra parte, además de los beneficios sociales que se derivan de la biotecnología aplicada a un cultivo que demanda un gran esfuerzo físico, con la tecnología establecida se logra la disponibilidad requerida de material homogéneo y de alta calidad; puede acortarse el proceso de producción; se evitan pérdidas por vitrificación, por la aplicación de condiciones innecesarias y por la utilización de componentes nacionales para el sustrato. Y también, el sistema es lo suficientemente flexible como para posibilitar su aplicación en biofábricas o laboratorios de producción de menor capacidad productiva.

Finalmente, además de las ventajas 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.

La recuperación henequenera constituye también una modesta contribución al programa de conservación de nuestros recursos naturales.

#### BIBLIOGRAFIA.

Castro L, Herrera JL, Robert ML, Loyola VM. 1989. Ammonia assimilation during the micropropagation of vitrified Agave fourcroydes. ASPP/CSPP 1989 Annual Meeting Jul 30-Aug 3. Royal York Hotel. Toronto, Ontario, Canadá.

Cruz Ramos CA, Orellana R, Robert ML. 1985. Agave research progress in Yucatan. Desert Plants. 7(2):71-73. Special Issue Symposium on the Genus Agave. Held at Desert Botanical Garden, Phoenix, March 7-9, 1985, in honor of the Centennial of Arizona State University, Tempe Edited by Donald J. Pinkava and Howard Scott Gentry.

Das T. 1992. Micropropagation of Agave sisalana. Plant Cell Tissue and Organ Culture 31:253-255.

Frydrych D. 1982. Induction in vitro de bourgeons adventifs a partir du sisal. Premiers resultats. Cot. Fib. Trop. 37(3):295-304.

Groenewald EG, Wessels DC & Koeleman A. 1977. Callus Formation And Subsequent Plant Regeneration from Seed Tissue of an Agave Species (Agavaceae). Z. Pflanzenphysiol. 81:369-373.

Herrera JL, Navarro Mastache LC y Robert ML. 1991. Tratamiento de preadaptación in vitro de plantas de Agave tequilana W. micropropagadas, con el objetivo de mejorar su calidad y su potencial de adaptación en aclimatación.

IV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Septiembre 8-12, 1991. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C./Instituto Tecnológico de Mérida. Mérida, Yuc., México.

Hunault G. 1979. Recherches sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotyledones cultives in vitro. II. Etude du cas de quelques Agavacees. Rev. Cytol. Biol. veget. Bot. 2:21-66.

Madrigal-Lugo R, Pineda-Estrada F, Rodríguez de la O JL. 1989. Agave. Handbook of Plant Cell Culture. Philip V. Ammirato, David A. Evans, William R. Sharp and Yashpal P.S. Bajaj. Vol. 5: Ornamental Species. MacGraw-Hill Publishing Co., New York. p. 206-227.

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

Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., 15: 473-497.

Powers DE & Backhaus RA. 1989. In vitro propagation of Agave arizonica Gentry & Weber. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 16:57-60.

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

Robert ML, Herrera JL, Chan JL & Contreras F. 1992. Micropropagation of Agave sp. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 19. High-Tech and Micropropagation III ed. by Y.P.S. Bajaj Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p.306-329

Shen Tsai-M, Cowen RD & Meyer Jr. MM. 1991. In vitro propagation of tuberose (Polianthes tuberosa L) Hortscience 26(6):140.

**Recibido :** 20 de enero de 1997.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por su colaboración en el intercambio de experiencias y resultados; a la Biofábrica de Ciego de Avila, la Empresa Henequenera "Eladio Hernández" de Matanzas, la Henequenera del Mariel y la Estación de Café y Cacao de Velazco, Holguín por las facilidades brindadas para el desarrollo del presente trabajo. De igual manera, agradecer la colaboración de Pedro Alvarez Cibreiro, fotógrafo del Jardín Botánico, por su colaboración en la preparación gráfica de este trabajo.