



Universidad de Matanzas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Maestría en Ciencias Agrícolas

Tesis Presentada en Opción al Grado de Máster en
Ciencias Agrícolas

Título: Evaluación del comportamiento de la propagación *in vitro* de nuevas accesiones (Subinerme y C-97) de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.)

Autor: Ing. Mohamed Sankoumba Fadiga

Tutores: Dr. C. Gerardo González Oramas

M. Sc. Maryla Sosa Del Castillo

Matanzas Diciembre, 2014



*Intenta no volverte un hombre de éxito, sino volverte un
hombre de valor*

Albert Einstein



NOTA DE ACEPTACION

--

Presidente del Tribunal

--

Tribunal

--

Tribunal

--

Tribunal

Evaluación



Declaración de autoridad

Declaro que yo, Mohamed Sankoumba Fadiga soy el único autor de este Trabajo de Diploma por lo que autorizo a la Universidad de Matanzas a hacer uso del mismo, con la finalidad que estime conveniente.



Dedicatoria

A mis padres El Hadj Sankoumba Fadiga y Ramatoulaye Balde por ser el mejor apoyo y ejemplo en toda mi vida y por ser los mejores padres.

A mi amado abuelo El Hadj Ba Kasso por el amor y enseñanza dada.

A mi familia entera por traerme amor, educación, carácter, atención y felicidad en tiempos tan difíciles.

A mi país que amo tanto y al cual dedico todos mis esfuerzos.

A mi novia y compañera Zowe Haile Onipogui Lorenzo por su amor único y apoyo constante e incondicional a lo largo de estos años.



Agradecimientos

A DIOS por ser el todo poderoso, omnipotente y misericordioso que ha guiado mis pasos desde que he visto la luz.

A mi país por la tremenda formación recibida.

A la Revolución cubana y a su pueblo que han hecho posible mi formación académica lejos de mi tierra.

A Orquídea mi madre y profesora de idioma español en preparatoria por el gran amor y educación que me ha dado.

A mi tutor y amigo el Dr. C. Gerardo González Oramas por la confianza puesta en mí y la gran enseñanza dada durante toda mi vida estudiantil.

A mi tutora, profesora, madre y amiga que tanto quiero, la M. Sc. Maryla Sosa Del Castillo por toda la atención, ayuda y cariño que me ha dado.

A la Ing. Jovana Pérez Ramos por su amistad y apoyo incondicional sin el cual no hubiera sido posible tener esta tesis.

Al Dr. Rolando Hernández Prieto por la educación dada, el inmenso apoyo y por haber dejado en uno, huellas para la vida. Siempre le recordaré.

A los profesores Sergio Rodríguez, Anesio Mesa, Enildo Abreu, Jorge Luis Alpízar, Antonio Delgado, Lionel Marrero, Jorge Luis Álvarez, Rolando León y Ramón Liriano por su profesionalismo, disponibilidad y su gran ayuda.

A todos los profesores que han contribuido a mi formación profesional y educación durante estos años.

A mi gran amigo Javier por su gran corazón y por ser el que siempre fue para mí en todos estos años.

A toda la comunidad guineana y especialmente a Boubacar Cissé y su novia Dayanna, Mohamed Siby y Ansoumane Camara en Matanzas por ser los mejores hermanos y amigos.

A mi familia Cheng de la Habana vieja por su un cariño y amor.

A Tottin, Kimix, Henry, Gueydou, Jalal, Osdiel y Jorge Alfonso por su amistad y calor humano.

A toda la familia Pinos Ramos y nuestros amigos Tony y Ayanidis por su apoyo y amistad tan grande.

A todos los que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.



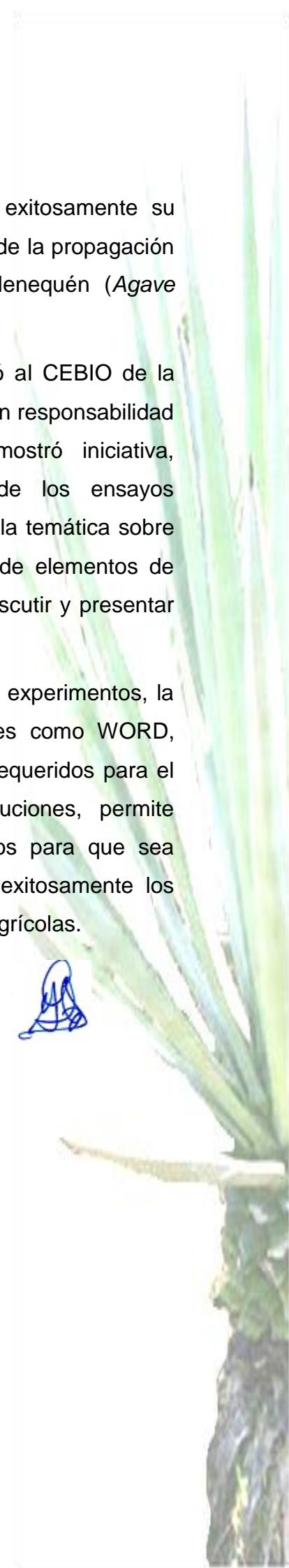
Opinión del tutor

El estudiante Mohamed Sankoumba Fadiga ha concluido exitosamente su trabajo de maestría titulado “Evaluación del comportamiento de la propagación *in vitro* de nuevas accesiones (Subinerme y C-97) de Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.)”.

Durante toda su etapa de maestrante, su trabajo se vinculó al CEBIO de la Facultad de Agronomía, donde mostró elevada seriedad y gran responsabilidad ante las disímiles tareas. En numerosas situaciones mostró iniciativa, autonomía y firmeza en el montaje y evaluación de los ensayos experimentales. La búsqueda de bibliografía actualizada, en la temática sobre la multiplicación asexual y la profundización en el estudio de elementos de biotecnología, fisiología, genética y estadística permitieron discutir y presentar los resultados obtenidos en la forma requerida.

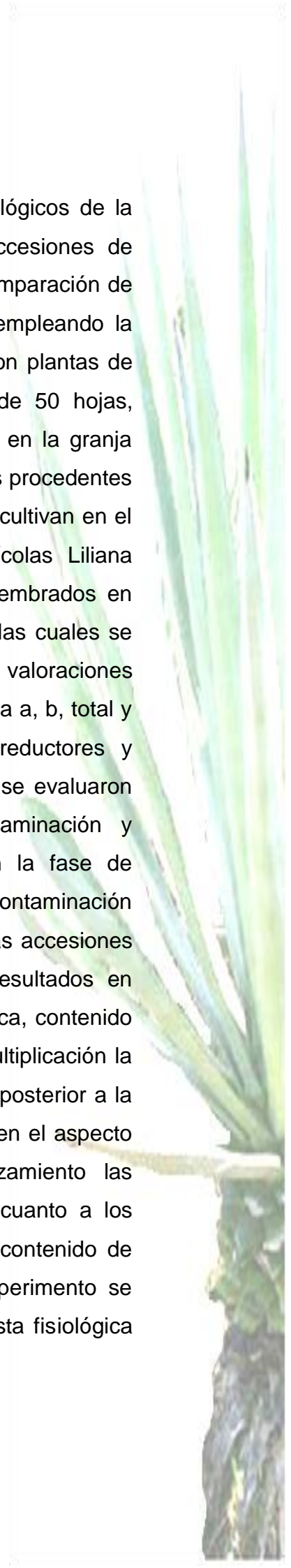
La disciplina y habilidad demostrada en la evaluación de los experimentos, la profundización en el dominio de los Software profesionales como WORD, EXCEL, STATGRAPHICS, y de los conocimientos teóricos requeridos para el análisis del problema planteado y la búsqueda de soluciones, permite considerar que el estudiante Mohamed reúne los requisitos para que sea gratificado con el máximo de puntuación y así completar exitosamente los requerimientos para obtener el título de Máster en Ciencias Agrícolas.

Firma



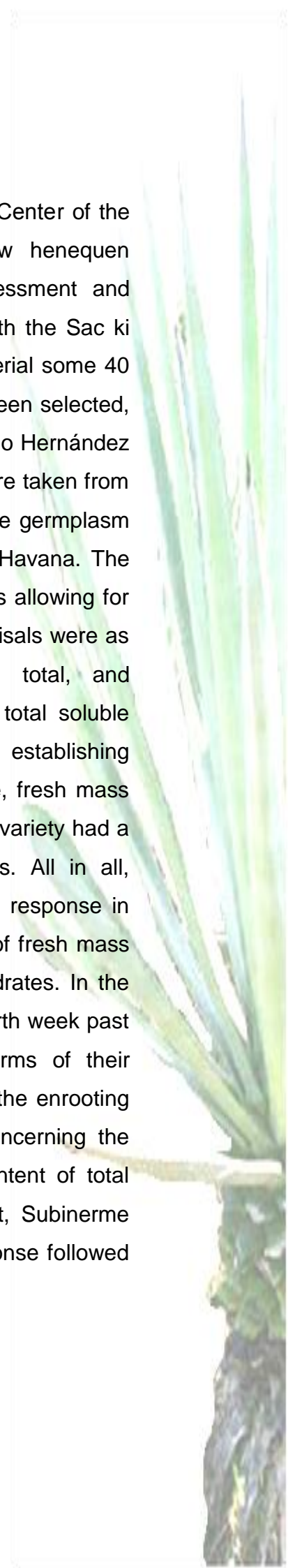
Resumen

Se realizó una investigación en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas para la incorporación de nuevas accesiones de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) mediante la evaluación y comparación de estas accesiones (Subinerme y C-97) con la variedad Sac ki empleando la técnica de cultivo *in vitro*. Como material original se seleccionaron plantas de henequén con una altura entre 40 y 50 cm y un promedio de 50 hojas, procedentes de áreas de plantación de uso comercial ubicadas en la granja Eladio Hernández. Además fueron seleccionados hijos de rizomas procedentes de plantas de las accesiones Subinerme y Clon 97 las cuales se cultivan en el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova de la Habana. Los explantes seleccionados fueron sembrados en condiciones *in vitro* transitando por cada una de sus etapas en las cuales se realizaron evaluaciones bioquímicas y fisiológicas. Las valoraciones bioquímicas fueron: contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, b, total y carotenoides), contenido de carbohidratos totales, azúcares reductores y proteínas solubles totales. Los indicadores fisiológicos que solo se evaluaron en la fase de establecimiento fueron: porcentaje de contaminación y supervivencia, incremento de masa fresca y masa seca. En la fase de establecimiento la variedad Sac ki tuvo un mayor porcentaje de contaminación con respecto a las accesiones. De forma general en esta fase las accesiones presentaron mejor respuesta fisiológica además de mejores resultados en cuanto a indicadores como incremento de masa fresca, masa seca, contenido de azúcares reductores y carbohidratos totales. En la fase de multiplicación la aparición de los brotes se presentó a partir de la cuarta semana posterior a la siembra y las accesiones presentaron un mejor comportamiento en el aspecto fisiológico e indicadores bioquímicos. En la fase de enraizamiento las accesiones y la variedad presentaron resultados similares en cuanto a los indicadores evaluados aunque existió una contradicción con el contenido de carbohidratos totales en la variedad Sac ki. A lo largo del experimento se destacó la accesión Subinerme por presentar una mejor respuesta fisiológica seguida de C-97 y la variedad Sac ki.



Abstract

A research has been carried out in the Biotechnological Studies' Center of the University of Matanzas aiming at the incorporation of new henequen accessions (*Agave fourcroydes* Lem.) by means of the assessment and comparison of the referred accessions (Subinerme and C-97) with the Sac ki variety using the *in vitro* cultivation technique. As an original material some 40 and 50 cm high and 50 leaves-averaged henequen plants have been selected, then withdrawn from a commercial use plantation area in the Eladio Hernández farm. Likewise it has been selected some young rhizomes that were taken from Subinerme and Clon 97 accessions' plants which are grown in the germplasm bank of the Horticultural Research Institute Liliana Dimitrova of Havana. The selected explants have been sowed *in vitro* following all due steps allowing for biochemical and physiological evaluations. The biochemical appraisals were as follows: photosynthetic pigments content (chlorophyll a, b, total, and carotenoids), total carbohydrates content, reducing sugars and total soluble proteins. The only physiological indicators evaluated during the establishing phase were the following: contamination and survival percentage, fresh mass and dry mass increase. During the establishing phase, the Sac ki variety had a higher percentage of contamination with respect to accessions. All in all, throughout this phase, accessions showed a better physiological response in addition to better results as regards indicators such as increase of fresh mass and dry mass; content of reducing sugars, and of total carbohydrates. In the multiplication phase, the appearing of shoots took place in the fourth week past the sowing, and accessions showed a better behavior in terms of their physiological aspect, and of biochemical indicators. In course of the enrooting phase, accessions and the variety presented similar results concerning the evaluated indicators, though a contradiction emerged in the content of total carbohydrates in the Sac ki variety. Throughout the experiment, Subinerme accession proved to have a remarkably better physiological response followed by C-97 and the Sac ki variety.



ABREVIATURAS.

(Entre paréntesis se indica la abreviatura utilizada generalmente en inglés)

AIA (IAA)	Ácido Indol Acético
ABA	Ácido Abscísico
ANA (NAA)	Ácido Naftalenacético
BA ó BAP	6-Bencilaminopurina
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
GA3	Ácido giberélico
IBA	Ácido Indolbutírico
KIN	Kinetina o furfurilaminopurina
MS	Sales minerales según formulación de Murashige y Skoog 1962.



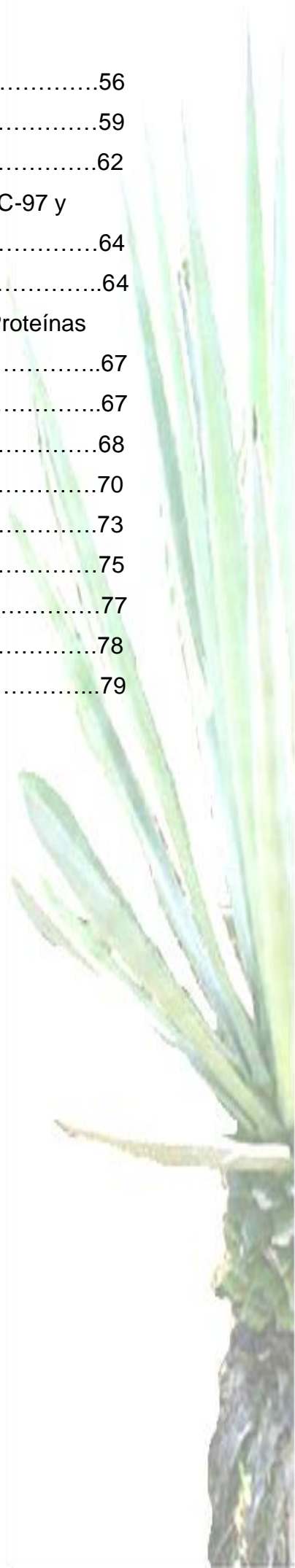
Índice

Contenido	Página
I. Introducción.....	1
Problema.....	3
Hipótesis.....	3
Objetivos.....	4
Novedad Científica.....	4
II. Revisión Bibliográfica.....	5
2.1. Generalidades de las Agaváceas.....	5
2.1.1. Distribución Geográfica.....	6
2.1.2. Clasificación Taxonómica.....	7
2.2. Generalidades del Henequén.....	7
2.2.1. Descripción Botánica.....	10
2.3. Diversidad Genética del <i>Agave fourcroydes</i> Lem.....	11
2.4. Características de las accesiones 97 y Subinerme.....	13
2.4.1. Perspectivas futuras.....	15
2.5. Reproducción del Género <i>Agave</i>	15
2.5.1. Características de las diferentes vías de propagación del Henequén.....	16
2.5.2. Propagación convencional.....	17
2.5.2.1. Propagación por Rizomas.....	17
2.5.2.2. Propagación por Bulbillos.....	18
2.5.2.3. Propagación por Bulbillos del escapo floral.....	18
2.5.3. Cultivo de tejidos <i>in vitro</i>	18
2.5.3.1. Propagación por Cultivo de Tejidos <i>in vitro</i> en <i>Agave</i>	19
2.5.3.2. Factores que determinan el éxito del cultivo <i>in vitro</i>	24
III. Materiales y Métodos.....	26
3.0.1. Selección del material vegetal.....	26
3.0.2. Preparación del material vegetal.....	26
3.0.3. Estudios fisiológicos de crecimiento y desarrollo.....	27
3.0.3.1. Evaluación del porcentaje de contaminación y supervivencia.....	27
3.0.3.2. Medición de la masa fresca, su incremento y masa seca.....	28
3.0.4. Estudios bioquímicos.....	29



3.0.4.1. Determinación del contenido de clorofila a, b, total y carotenoides.....	29
3.0.4.2. Determinación del contenido de Carbohidratos totales.....	29
3.0.4.3. Determinación del contenido de Azúcares reductores.....	30
3.0.4.4. Determinación del contenido de proteínas.....	31
3.1. Evaluación del comportamiento de las accesiones Subinerme, C-97 y variedad Sac ki en la etapa de Establecimiento.....	31
3.2. Evaluación del comportamiento de las accesiones Subinerme, C-97 y variedad Sac ki en la etapa de Multiplicación.....	31
3.3. Evaluación del comportamiento de las accesiones Subinerme, C-97 y variedad Sac ki en la etapa de Enraizamiento.....	32
3.4. Análisis Estadístico.....	32
3.5. Análisis Económico.....	32
IV. Resultados y Discusión.....	34
4.0. Evaluación del comportamiento de las accesiones Subinerme, C-97 y variedad Sac ki en la etapa de establecimiento.....	34
4.0.1. Indicadores del crecimiento.....	34
4.0.1.1. Porcentaje de Contaminación y Supervivencia.....	34
4.0.1.2. Masa Seca e Incremento en Masa Fresca.....	39
4.0.2. Indicadores bioquímicos.....	42
4.0.2.1. Contenido de pigmentos fotosintéticos.....	42
4.0.2.1.1. Contenido de clorofila a.....	42
4.0.2.1.2. Contenido de clorofila b.....	43
4.0.2.1.3. Contenido de Clorofila total.....	43
4.0.2.1.4. Contenido de Carotenoides.....	44
4.0.2.2. Contenido de Carbohidratos totales, Azúcares reductores y proteínas solubles.....	46
4.0.2.2.1. Proteínas Solubles.....	46
4.0.2.2.2. Carbohidratos totales.....	48
4.0.2.2.3. Azúcares reductores.....	50
4.1. Evaluación del comportamiento de las accesiones Subinerme, C-97 y variedad Sac ki en la etapa de Multiplicación.....	52
4.1.1. Contenido de pigmentos fotosintéticos.....	54
4.1.2. Contenido de Carbohidratos totales, Azúcares reductores y proteínas solubles.....	56

4.1.2.1. Proteínas solubles.....	56
4.1.2.2. Carbohidratos totales.....	59
4.1.2.3. Azúcares reductores.....	62
4.2. Evaluación del comportamiento de las accesiones Subinerme, C-97 y variedad Sac ki en la etapa de Enraizamiento.....	64
4.2.1. Contenido de pigmentos fotosintéticos.....	64
4.2.2. Contenido de Carbohidratos totales, Azúcares reductores y Proteínas solubles.....	67
4.2.2.1. Proteínas solubles.....	67
4.2.2.2. Carbohidratos totales.....	68
4.2.2.3. Azúcares reductores.....	70
4.3. Valoración económica.....	73
4.4. Análisis Ambiental.....	75
V. Conclusiones.....	77
VI. Recomendaciones.....	78
VII. Referencias Bibliográficas.....	79



I. Introducción

El henequén *Agave fourcroydes* Lem. es una especie perenne de propagación vegetativa que al igual que otros representantes del género *Agave*, es un clon pentaploide ($n = 30$) con reducida fertilidad, donde la escasa reproducción sexual que pudiera ocurrir se excluye por el corte de la inflorescencia, para evitar el efecto negativo que esta causa sobre la calidad de la fibra.

El uso de los agaves es amplio, incluyendo la preservación del paisaje y la conservación del suelo; pero su mayor importancia económica, está en la utilización de las hojas y tallos como fuente de materia prima para la producción de fibras textiles (sisal), y el jugo en la elaboración de bebidas (tequila) (Garriga *et al.*, 2010).

El henequén que es una fuente de fibras largas con diversos usos, ofrece en la actualidad nuevas oportunidades, dada la ampliación del mercado de la fibra natural y las tendencias actuales encaminadas a la conservación del medio ambiente. Además resulta ser un cultivo altamente productivo en áreas ecológicamente limitadas por la escasez de agua y la existencia de suelos de baja fertilidad junto con sus potencialidades para la producción de productos naturales como esteroides y detergentes a partir de sus sapogeninas (Robert *et al.*, 1992) y principios activos para la industria farmacéutica y la industria agropecuaria (Eastmond *et al.*, 2000).

Las plantas de agaves son convencionalmente propagadas por los bulbillos que se originan de los meristemos axilares sobre la inflorescencia después de la floración, sin embargo, esto ocurre luego de un largo período de crecimiento vegetativo, el cual puede ser por un periodo que puede variar entre 8 y 20 años, dependiendo de la especie. La mayoría de las plantas no forman semillas o son de baja viabilidad, así que la reproducción por esta vía no es conveniente. Para el logro en un tiempo más reducido de plantaciones homogéneas de henequén y de alta calidad se presenta la micropropagación como alternativa a la propagación convencional de las especies pertenecientes al género *Agave*. En Cuba, el cultivo del henequén experimentó un descenso de los rendimientos en los últimos años, pues muchas de las áreas fueron

demolidas, quemadas y otras sufrieron el abandono y la invasión de vegetación indeseable (Abreu *et al.*, 2007).

Existe un elevado grado de deterioro en las plantaciones de henequén en Matanzas, además de una disminución gradual de los campos cultivados y de posturas de calidad. Esto ha conllevado a una reducción significativa en la producción de fibra. A esto se suma el empleo de una sola variedad de henequén conocida como Sac ki lo que sugiere una vulnerabilidad del cultivo por su reducida biodiversidad.

Con la perspectiva de hacer posible la incorporación de nuevas accesiones de henequén empleando la técnica de cultivo *in vitro*, se realizó esta investigación basada en la evaluación y comparación del comportamiento de las nuevas accesiones (Subinerme y C-97) con la variedad Sac ki anteriormente empleada.

La necesidad de comparar las accesiones entre ellas y con la variedad Sac ki yace en el hecho de que existe la posibilidad de la obtención de una respuesta diferente para cada una de las variantes a través de mecanismos inducidos por el medio empleado. En este sentido, Peña *et al.* (2012) encontraron que *Agave fourcroydes* y *A. angustifolia* presentan una expresión diferencial del gen KNOX1 durante condiciones *in vitro*, el cual es epigenéticamente regulado por marcadores.

Lo anterior sugiere que dos clones pueden tener respuestas diferentes a condiciones *in vitro* iguales en cuanto a su ontogenia y ello puede determinar si una crece mejor que otra.

Entonces la identidad epigenética específica de cada una de las accesiones evaluadas junto con el efecto de los reguladores del crecimiento sobre la expresión genética de las mismas ponen de manifiesto la necesidad de comparación entre clones genéticamente similares.

Problema

El creciente peligro a la sostenibilidad de la producción henequenera debido al uso de solo una variedad de Henequén en Cuba conocida como Sac ki (Henequén blanco) así como la disminución significativa de la calidad de las plantaciones por el uso indiscriminado de todo tipo de material ante un incremento en la necesidad de posturas, despierta la urgencia de investigaciones encaminadas a evitar o eliminar una catástrofe ecológica y económica en dicha industria. Una de las alternativas para poder superar los problemas antes mencionados es la propagación de nuevas accesiones con el empleo de la técnica de cultivo *in vitro*.

Hipótesis

Si se logra establecer la propagación *in vitro* de nuevas accesiones de Henequén entonces permitirá validar esta vía de multiplicación asexual y contribuirá al incremento de la Biodiversidad en *Agave fourcroydes* Lem.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el comportamiento de la propagación *in vitro* de nuevas accesiones de Henequén que permita favorecer el incremento de la biodiversidad en esta especie.

Objetivos Específicos

- Evaluar bioquímicamente las diferentes accesiones de henequén bajo condición *in vitro* y en sus diferentes etapas de crecimiento.
- Analizar indicadores fisiológicos en las diferentes accesiones en cada una de las fases del cultivo *in vitro*.
- Validar la tecnología de propagación *in vitro* propuesta para el Henequén en estas nuevas accesiones.

Novedad Científica

El estudio de la respuesta fisiológica de nuevas accesiones de henequén en condiciones *in vitro* con la perspectiva de introducirlas por primera vez a la industria henequenera, permitió caracterizar y validar una técnica para la micropropagación masiva de las mismas y así posibilitar en alguna medida el incremento de la biodiversidad en dicha industria.

II. Revisión Bibliográfica

2.1. Generalidades de las Agaváceas

El género *Agave* pertenece a la familia de las *Agaváceas* y comprende numerosas especies originarias de las zonas desérticas de América (elicriso, 2013). De hecho, hay cerca de 200 especies, pero están mayormente en el centro y norte de México (Info Rural, 2013). México es el centro de origen de la familia Agavácea, a la cual pertenecen ocho géneros, entre ellos el género *Agave*. De las 273 especies descritas de esta familia que se distribuye en el continente americano desde Dakota del Norte, EUA, hasta Bolivia y Paraguay, en México se encuentra la mayor diversidad con 205 especies, de las cuales 151 son endémicas (Buenas tareas, 2011). *Agave* quiere decir, en griego, distinguido, admirable o noble. El nombre científico de agave fue puesto por Carlos Linneo en 1753, quien inventó el sistema para nombrar científicamente a las plantas. Es por eso que este nombre, agave, es patrimonio científico de la humanidad (Info Rural, 2013). Los agaves son rosetas perennes que requieren de muchos años para crecer y florecer. Mientras van creciendo van acumulando recursos por un periodo que puede variar entre 8 y 20 años dependiendo de la especie, después del cual desarrollan una inflorescencia terminal o escapo. La mayor parte de las plantas son monocárpicas, es decir que florecen una sola vez en su vida y después de la floración y la maduración de los frutos mueren (elicriso, 2013). Las plantas que florecen repetidamente son rosetas policárpicas.

Desde la época prehispánica los agaves han sido usados por los seres humanos y continúan siendo ampliamente utilizados como fuentes de alimento, bebidas, materiales de construcción y medicinas naturales (Arizaga y Escurra, 2002). También se sabe que se utilizan para producir esteroides, productos para cosmetología, fibras como el henequén, combustible y jabón (Piven, *et al.*, 2002). Gentry (1982) afirma que el cultivo de diferentes especies de *Agave* para la producción de pulque se desarrolló con las civilizaciones mesoamericanas. Un desarrollo más reciente, especialmente en los últimos dos siglos, es la producción de licor destilado como el mezcal y el tequila, considerándolas un grupo de plantas de amplia utilización.

2.1.1. Distribución Geográfica

Los miembros del género *Agave* son nativos de Norteamérica, Centroamérica, el Caribe y Sudamérica y se distribuyen en latitudes de 40° N y 6° N (Arizaga y Escurra, 2002). Dominan vastas áreas, en particular ambientes xerofíticos (Silva-Montellano y Eguiarte, 2003). El género cuenta con 166 especies de las cuales 125 se encuentran en México (García-Mendoza y Galván, 1995). Se considera a la Altiplanicie Mexicana como su centro de distribución, reconociendo que las llanuras centrales y la subregión del Sur (Puebla y Morelos) es donde se encuentra la mayor riqueza de especies, la cual disminuye considerablemente al sur del Istmo de Tehuantepec, así como, Sonora y Baja California (fig. 1).



Figura 1. Distribución del género *Agave*

2.1.2. Clasificación Taxonómica

Taxonómicamente el género *Agave* que incluye aproximadamente 166 especies se ubica en la familia *Agaváceas*. En el Continente Americano se han reportado aproximadamente 310 especies sin embargo no existe un acuerdo en cuanto al número de estas (Good-Avila *et al.*, 2006).

El género fue dividido por Gentry (1982) en dos de acuerdo a la forma de su inflorescencia. El subgénero *Littaea* está compuesto por plantas que poseen una inflorescencia de tipo espigada o racemosa, con flores sésiles distribuidas a lo largo de un pedúnculo común. Las plantas del subgénero *Agave* tienen inflorescencias paniculadas, es decir, una inflorescencia ramificada con flores que nacen en las ramas laterales o umbelas. El subgénero *Agave* está constituido por cerca de 102 especies y está dividido en 12 grupos.

Reino: Plantae.

Subreino: Traqueófitas o plantas vasculares.

División: Magnoliophyta (Angiospermae, plantas con flores)

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas)

Clase: Liliopsida (Monocotiledóneas)

Subclase: Liliidae (Lílicas)

Orden: Liliales. Ahora incluidas en los Asparagales.

Familia: Agaváceas (Agavaceae). Algunos autores la incluyen en las Amarilidáceas (Amarilidaceae), tal como lo hizo Carl Linaeus en 1748.

Nombre científico: *Agave fourcroydes* Lemaire

2.2. Generalidades del henequén

El henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) es una planta monocotiledónea, del género de los agaves, perteneciente a la familia de las *Agaváceas*. Es originario de Yucatán, donde fue llamado *Ki*. Fue domesticado en la época prehispánica por los mayas, debido a la utilidad de sus fibras. Su origen se atribuye a la especie *A. angustifolia*, que es considerada su ancestro. Las diferencias entre estas dos especies se deben al aislamiento durante el periodo de domesticación. Además de la Península de Yucatán, el henequén fue introducido exitosamente en algunas zonas de Tamaulipas, Veracruz, y en

Cuba, regiones en las cuales se encuentra restringido su cultivo (Financiera rural, 2011).

El henequén es conocido como una planta resistente, que no requiere gran atención cultural, por lo que su producción no es costosa, además de poder ser aprovechada integralmente, debido a sus múltiples usos. El principal consumo es industrial, en la fabricación de cuerdas, sogas, sacos, hilos, etc. También se utiliza para la elaboración de artesanías como alfombras, tapices, tapetes y hamacas. A partir de él se pueden elaborar bebidas alcohólicas y recientemente se está estudiando su posible uso para la fabricación de etanol. Asimismo, del henequén puede extraerse pasta de papel, abono, biogás, la pulpa procedente del desfibrado puede servir como alimento de ganado, pueden extraerse ceras para uso industrial y hecogenina, que es un producto básico para diferentes fármacos de gran demanda mundial. El jugo de henequén puede usarse también como biodetergente para el fregado y lavado, y como emulsionante para combustibles (ASERCA, 2011).

Por la gran envergadura de explotación industrial, el henequén se ganó el nombre de "Oro verde" en la península del Yucatán antes de trasladarse al mundo empezando primero por la Florida, Cuba, Israel, algunos países de África, principalmente Tanzania y Kenia, y finalmente Brasil, donde se logró con mucho éxito su adaptación al suelo y clima de la región noreste de ese país sudamericano.

Gracias a su alta gama de productos en el mercado, se ha ido incrementando la producción a nivel mundial y se puede observar que Cuba ocupó el octavo lugar con un 3% de la producción mundial en los años 2004-2005 (Tabla 1).

Tabla 1. Producción de henequén y otras fibras provenientes de agaves

Producción en toneladas de henequén y de otras fibras provenientes de agaves. Cifras 2004-2005 Datos de FAOSTAT (FAO) Base de datos de la FAO				
Brasil	199 322,00	54 %	213 082,00	55 %
México	26 636,00	7 %	26 636,00	7 %
Kenia	25 000,00	7 %	25 000,00	6 %
Tanzania	23 500,00	6 %	23 500,00	6 %
Colombia	21 498,00	6 %	22 000,00	6 %
Madagascar	17 000,00	5 %	17 000,00	4 %
China	16 000,00	4 %	16 000,00	4 %
Cuba	11 700,00	3 %	11 730,00	3 %
Haití	5 500,00	1 %	5 500,00	1 %
Nicaragua	4 350,00	1 %	4 350,00	1 %
Filipinas	4 000,00	1 %	4 000,00	1 %
Venezuela	3 239,00	1 %	3 500,00	1 %
Ecuador	4 963,00	1 %	3 465,00	1 %
El Salvador	2 500,00	1 %	2 500,00	1 %
Marruecos	2 200,00	1 %	2 200,00	1 %
Otros	5 000,00	1 %	5 000,00	1 %
Total	372 408,00	100 %	385 463,00	100 %

La posición de Cuba en la producción mundial refleja los numerosos problemas a los que se enfrenta la industria henequenera junto con la creciente necesidad de aprovechar el vasto espectro de productos y subproductos que de ella proviene, se ha emprendido esta investigación en búsqueda de la resolución de algunos de los problemas que impiden la ocupación de un lugar más alto en la tabla anterior.

2.2.1. Descripción Botánica

Raíces: El henequén como planta monocotiledónea concuerda con otras de esta clase al poseer un sistema radicular fibroso desparramado, formando penachos sin raíz principal que se encuentra entre los 30-40 cm de profundidad.

Rizomas: Los rizomas son tallos subterráneos, carnosos y blancos que brotan de la base de la planta, variando en grosor y longitud, poseen numerosas hojas escamosas pequeñas que protegen los brotes que posteriormente producirán retoños. El brote terminal del rizoma da lugar aproximadamente después de un año a un retoño el que forma raíces adventicias, pudiendo así independizarse de la planta madre.

Tallo: El tronco o tallo del henequén alcanza una altura de 1,30 m, su diámetro es de 20 cm en el momento en que la planta está lista para su explotación (4-5 años de edad), período a partir del cual el diámetro no aumenta más, ocurriendo solamente el crecimiento en su parte inferior. El tallo constituye el eje de la planta donde se insertan las hojas y es un órgano donde hay una gran acumulación de sustancias de reserva.

Hojas: Las hojas del henequén tienen una forma de roseta, generalmente fuertes, carnosas y perennes, con los bordes dentados y el ápice terminado en una aguda espina. Además son sésiles, largas y carnosas, un poco estrechas cerca de la inserción y acanaladas; forman con el tallo un ángulo cada vez más cubierto a medida que son más inferiores.

Inflorescencia: Es en racimo, cuyas flores se agrupan sobre un escapo que sale del centro de la planta; el perianto es simple y sepaloide, formado por seis

lacinias arregladas regularmente en dos verticilos trímeros, alternando con seis estambres opuestos a las lacinias del perianto e insertadas en su base, con anteras biloculadas, terminado en un estigma simple; ovario ínfero de tres lóculos, el fruto es una cápsula polisperma de dehiscencia loculicida.

La floración del henequén tiene lugar después de los 6 a 10 y hasta 20 a 25 años, según la especie y el país donde se desarrolle. Lo más común es observar que el henequén emite el escapo floral al final de su ciclo vegetativo, esta etapa se observa cuando las hojas más jóvenes forman una roseta apretada y estas son estrechas y afiladas y se van cortando a medida que comienza a emerger en el centro de la planta dicho escapo floral, el tallo floral puede alcanzar hasta 8 m.

La polinización ocurre cuando los estambres vierten su polen 2 o 3 días antes que el estilo se alargue completamente y su estigma haya producido un exudado pegajoso, para más tarde volverse receptivo. No obstante al hecho que su escapo floral puede ser reconocido más fácilmente por los polinizadores por la altura que alcanza, la producción de frutos es baja (entre 6 y 20%), sugiriendo limitación en la fecundidad por polinizadores (Buenas tareas, 2011).

Las plantas de este género presentan varias adaptaciones a su medio; tienen la capacidad de acumular agua en las gruesas hojas suculentas lo que permite que estén especialmente adaptadas a la aridez.

2.3. Diversidad genética del *Agave fourcroydes* Lem.

La diversidad genética de este cultivo antes de la llegada de los colonizadores no se conocía y no fue hasta entre 1814 y 1914, período en el que se produjo una plantación intensiva de henequén, del cual se encontraron referencias de su diversidad y en los cuales se menciona el cultivo de la especie salvaje tanto como de siete variedades de henequén: Yaax Ki, Sac ki, Chucum Ki, Bab Ki, Kitan Ki, Xtuk Ki y Xix Ki (Colunga, 1996).

Una exploración etnobotánica efectuada entre 1985 y 1987, en varias localidades del estado mexicano de Yucatán (Colunga, 1996) indicó que la diversidad del henequén había decrecido dramáticamente desde los inicios de

este siglo, donde sólo tres de las siete variedades descritas previamente se encontraron (Colunga y May Pat, 1997), siendo la predominante de estas la Sac Ki o henequén blanco, especie esta última, extendida a todas las áreas henequeneras de Cuba.

El cultivo de *Sac ki* o henequén blanco ha sido el más difundido en las plantaciones, por la calidad de su fibra, en tanto que el *Yaax ki* es de menor calidad y rendimiento, se encuentra en peligro de extinción, debido a que fue dejado de cultivar, aunque es más recomendable para la fabricación de bebidas destiladas, debido a que posee un aroma y sabor característicos. Por su parte el *Kitam ki*, tiene fibras más suaves y bajo rendimiento, se considera casi extinto y es preferido en el uso textil. La pérdida de las otras variedades de henequén durante el siglo XIX e inicios del XX, se debe al establecimiento de plantaciones extensivas de Sac Ki (henequén blanco) en Yucatán, debido a la preferencia de la industria cordelera por esta variedad (Financiera rural, 2011).

La península de Yucatán es su centro de origen y diversidad fuera de ella solo se ha cultivado con éxito en algunas regiones de Tamaulipas y en Cuba a partir de germoplasma yucateco.

En Cuba, el henequén que se cultiva se introdujo de México alrededor de 1850 (Carrión, 1988), existiendo reportes de que además del *A. fourcroydes* Lem. se introdujeron entre otras especies *A. letonae*, *A. decipiens* y *A. mayana* (Carrión, 1988), por lo tanto estas referencias sugieren que es posible encontrar variabilidad dentro de las plantaciones de henequén, esto de ser cierto permitirá establecer con mayor éxito un programa de mejoramiento genético basado en una selección continua y propagación de individuos con características distintivas.

El proceso de fitomejoramiento por cruzamientos controlados es muy difícil de efectuar en especies con un ciclo de vida largo y una ineficiente reproducción sexual (Colunga, 1998) como es el caso del henequén. Esta es una especie que produce entre 15 y 20 hijuelos durante su ciclo de vida (Peña *et al.*, 1997), lo que permite disponer de suficiente material para mantener las poblaciones, sin embargo, esto no es suficiente para establecer un programa de selección y mejoramiento (Eastmond *et al.*, 2000).

La variabilidad genética de los *agaves* ha sido poco estudiada (Colunga, 1996) y la variación preexistente dentro de las plantaciones es totalmente desconocida, por lo que se carece de criterios de selección, aunque estudios recientes evidencian la existencia de variabilidad en plantas propagadas por la vía tradicional (González *et al.*, 2003).

Por una parte, es importante generar líneas clonales genéticamente estables; pero por la otra, la aparente reducción de la diversidad genética del henequén llevada al extremo por el favorecimiento de una sola variante a través de la propagación vegetativa debe ser analizada.

Por ello, el análisis de la variación genética dentro de las plantaciones naturales y micropropagadas de henequén, es de gran relevancia para el mejoramiento y manejo del cultivo (Infante *et al.*, 2002).

2.4. Características de las accesiones 97 y Subinerme

Pese a su importancia económica, los *agaves* nunca han sido mejorados genéticamente debido, principalmente, a que se propagan asexualmente y tienen un ciclo de vida muy largo (Robert *et al.*, 1992). El número de instituciones que se han orientado al mejoramiento genético del henequén en las últimas décadas se encuentra muy bajo. No obstante a ello, instituciones como la Estación Experimental de M'lingano en Tanzania ha desarrollado en un espacio de 30 años un programa de mejoramiento de *agaves* por medio de cruza inter-específicos donde se obtuvo el híbrido 11648 (Vinent y Fajardo, 2009). Este híbrido 11648 fue el objeto de diversos estudios en conjunto con otros, tales como los clones 97 y Subinerme. Estos últimos fueron obtenidos tras diferentes estudios de mejoramiento genético en el IIHLD. Los estudios llevados a cabo fueron:

- Desarrollo de accesiones de *agaves* a partir de plantas madres obtenidas en campos de producción de henequén en Cuba, con escasas espinas en los márgenes de las hojas.
- Desarrollo de accesiones de *agaves* a partir de la segregación del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.).

Las investigaciones realizadas entre los años 1993 y 2006 permitieron llegar a conclusiones que apuntaron a los clones 97 y Subinerme o 31-10 como acciones de importante valor en la producción henequenera.

Los estudios realizados sobre un número de 10 accesiones de las cuales los clones 97 y 31-10, revelaron las siguientes características:

- La accesión 31-10 se encuentra entre las primeras seis de mayores rendimientos de fibra seca además de ser la de menor número de espinas en sus márgenes que además se mantuvieron estables en sus descendencias.
- La accesión 97 resultó ser la de mayor longitud de hojas, g/planta de fibra seca así como resistencia tensil de la fibra. La accesión 31-10 tiene valores cercanos a los alcanzados por 97 en cuanto a estos indicadores.
- La accesión 97 tiene el valor más bajo de hoja/litro de jugo (1,40) lo que significa que se necesita 1,4 hojas para obtener 1L de jugo.
- En el análisis de componentes principales, la única accesión que alcanzó el mayor desarrollo vegetativo (ancho de hoja y altura de la planta) fue la accesión 97.

Estos resultados demuestran el gran potencial productivo y por ende industrial que pudieran tener estas accesiones al ser implementadas en la industria henequenera ya que se caracterizan por su mayor crecimiento, la ausencia de espinas, el mayor número de hojas, la mejor calidad de su fibra y la mayor producción de jugos.



Figura 2. Fotos de accesiones Subinerme y 97 en condiciones de campo en el IIHLD

2.4.1. Perspectivas futuras

Las accesiones (Subinerme y Clon 97) que se emplean en la investigación son accesiones que presentan características productivas favorables al incremento tanto de la producción como de la calidad de la fibra en la industria henequenera por su peculiaridad en cuanto a crecimiento rápido en una y ausencia de espina en la otra.

La necesidad de introducción de tales accesiones junto con el henequén blanco también conocido como Sac ki está dada por la situación actual anteriormente discutida. Esta investigación por lo tanto va encaminada hacia la necesidad actual en la industria henequenera de introducir nuevas accesiones para el incremento de la producción. Pero esta necesidad se encuentra guiada por las actuales posibilidades materiales y financieras que restringen la investigación dentro de un cierto marco en cuanto a la movilidad en los objetivos de la misma; esto lleva a la conclusión de que los resultados de esta investigación pueden servir de base a estudios posteriores que pueden resultar más ideales para la actual problemática y que pudieran proveer de una accesión con las características de todas las accesiones implementadas. En otras palabras, se hace alusión a las modificaciones genéticas que posibilitarían la obtención de alguna accesión que conjugue la eliminación de espinas, un crecimiento más rápido con mayor número de hojas, una mayor resistencia a plagas y enfermedades, una mejor calidad de la fibra y por último una mejor adaptabilidad al cultivo *in vitro* para su propagación a gran escala.

2.5. Reproducción del Género Agave.

Estas plantas pueden propagarse por dos mecanismos: La producción de semillas a través de la reproducción sexual de las rosetas semélperas (monocárpicas) y la multiplicación vegetativa, o clonación (Arizaga y Escurra, 1995).

Cuando comienza la floración, los agaves desarrollan una gran inflorescencia terminal o tallo que florece (conocido botánicamente como escapo y llamado comúnmente quiote o varejón), como resultado de un rápido alargamiento del meristemo apical después de años de crecimiento vegetativo de la roseta basal

(Arizaga, *et al.*, 2000). Una característica interesante de la inflorescencia es la presencia de brácteas a veces grandes que se van haciendo pequeñas hacia el extremo de la misma.

2.5.1. Características de las diferentes vías de propagación del henequén

La propagación convencional de las plantas de agaves generalmente se realiza por bulbillos originados de los meristemos axilares sobre la inflorescencia después de la floración, aunque esta ocurre después de un largo período de crecimiento vegetativo, el cual puede variar entre 8 y 20 años, dependiendo de la especie, como el caso de *A. sisalana* de 8 a 9 años hasta que la planta adulta entre en estado reproductivo y comience a florecer y en el caso de *A. cocui* entre 8 y 12 años (Yépez, 2001). La mayoría de las plantas no forman semillas o son de baja viabilidad, así que la reproducción por esta vía no es conveniente. Otra forma de reproducción es por estolones. Cada estolón termina en una planta joven. Bajo condiciones ambientales adecuadas cada planta adulta puede originar pocos estolones en un año, es decir, de 6 a 12 plantas anuales por individuo, siendo muy ineficiente este tipo de propagación por el escaso número de plantas regeneradas.

La micropropagación como alternativa a la propagación convencional de las especies pertenecientes al género *Agave*, permite que en menor tiempo se logren plantaciones de henequén homogéneas y de alta calidad en el país (González *et al.*, 2002). Las técnicas de “cultivo *in vitro*” se constituyen en una práctica valiosa, ya que es uno de los mejores métodos para la obtención de un alto número de clones para el continuo establecimiento de plantaciones y sería la complementación ideal del sistema de multiplicación natural por bulbillos o hijos basales de los rizomas propagados en el campo permitiendo así obtener un mayor número de plantas en un tiempo más reducido, en un espacio más reducido, con una mayor homogeneidad genética, una mayor respuesta productiva en el campo así como mayor calidad a nivel de industria. No obstante a estas ventajas, se necesita en esta técnica del cumplimiento de una serie de requisitos entre los cuales se ubica la necesidad de un personal calificado para el trabajo en condiciones de laboratorio, el alto respeto a la asepsia a lo largo de todo el proceso así como el respeto de todas las demás normas que rigen la propagación *in vitro*. De no ser respetados estos puntos,

ocurriría un gran descenso de la eficiencia de esta técnica hasta puntos que se haría obsoleta para cualquier especie.

2.5.2. Propagación convencional

La propagación convencional del henequén se ejecuta de diversas formas: mediante la reproducción sexual usando semillas y la asexual. Asexualmente el henequén como otros agaves tiene dos mecanismos de propagación: el primero es mediante los rizomas que son brotes subterráneos que crecen desde el meristemo a la base del tallo, y el segundo por bulbillos que son yemas aéreas encontradas en el escapo floral (González *et al.*, 2003).

Por las mismas características morfo-fisiológicas del henequén existe una unanimidad casi total a nivel de autores ya que coinciden en la baja efectividad de la propagación por semillas. Por ejemplo, Otero (1999) no recomienda el uso de la semilla ya que según él, se necesita de mucho tiempo para el desarrollo de nuevas plantas. Añade señalando que las semillas de los agaves se usan raramente, debido a que las plantas no las producen, a menos que las flores se polinicen artificialmente. De la misma forma Piven *et al.* (2001) apoyaron la idea de no usar esta vía de propagación al plantear que unido a la baja frecuencia de producción de semillas se suma la obtención en sus experimentos de solo un 0,08% en proporción de granos maduros de polen esférico (forma adecuada) además de tener un 66,4% de esterilidad para los granos de polen en su totalidad.

2.5.2.1. Propagación por Rizomas

Los rizomas son tallos subterráneos, carnosos y blancos que brotan de la base de la planta, variando en grosor y longitud, poseen numerosas hojas escamosas pequeñas que protegen los brotes que posteriormente producen retoños. El brote terminal del rizoma da lugar aproximadamente después de un año a un retoño el que forma raíces adventicias, pudiendo así independizarse de la planta madre (Otero, 1999).

2.5.2.2. Propagación por Bulbillos

Los bulbillos surgen de pequeños brotes protegidos por brácteas. Cada bulbillo es una plántula que posee de 6 a 8 hojas reducidas con un sistema radicular rudimentario, un escapo floral puede producir hasta 150 bulbillos según el Instructivo Técnico del Cultivo (Otero, 1999).

2.5.2.3. Propagación por Bulbillos del Escapo Floral

Lo más común es observar que el henequén emite el escapo floral al final de su ciclo vegetativo, esta etapa se observa cuando las hojas más jóvenes forman una roseta apretada y estas son estrechas y afiladas y se van cortando a medida que comienza a emerger en el centro de la planta dicho escapo floral (Otero, 1999).

Estas dos últimas fuentes de posturas (**2.5.2.2 y 2.5.2.3**) fueron las empleadas para iniciar el cultivo *in vitro* mediante la recolección de material procedente del banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Hortícolas `` Liliana Dimitrova ``.

2.5.3. Cultivo de tejidos *in vitro*.

El término genérico “cultivo de tejidos vegetales” involucra a diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo a los protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante éstas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microorganismos en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas. También se lo conoce como “cultivo *in vitro* de plantas” por realizarse en recipientes de vidrio (hoy también de otros materiales). Entonces el cultivo *in vitro* consiste en tomar una porción de una planta (a la que se denominará explante, como por ejemplo el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla o antera) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerarán una o muchas plantas.

Los métodos de cultivo de tejidos *in vitro* más comunes consisten en la fragmentación de nudos, ápices y yemas axilares, los cuales son manipulados

en condiciones asépticas y transferidos al medio de cultivo, para posteriormente inducir, mediante una concentración adecuada de reguladores del crecimiento, su proliferación y posterior sub-cultivo de brotes *in vitro*. Estas metodologías permiten la obtención de plantas genéticamente similares a una velocidad de producción considerablemente superior a cualquiera de los métodos tradicionales. Estas técnicas en realidad son extensiones de los métodos convencionales de propagación clonal, pero llevadas a cabo a escala miniatura, bajo condiciones asépticas, razón por la cual a este tipo de propagación clonal, se le conoce como micropropagación (Dodds y Roberts, 1985).

La propagación de plantas *in vitro* es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica. Permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida. Los cultivos son realizados por personal especializado en medios específicos (hormonas, minerales, vitaminas, fuente de carbono, agente gelificante, agua) y condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad y luz). Una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso de modo de llevarlo a mayor escala de producción.

La micropropagación (propagación clonal por cultivo *in vitro*) constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales.

En esta investigación se realizarán ensayos que permitirán valorar la respuesta de la propagación de estas accesiones bajo condiciones *in vitro* con el fin de valorar sus potencialidades en la obtención de posturas de alta calidad.

2.5.3.1. Propagación por Cultivo de Tejidos *in vitro* en Agave.

La propagación *in vitro* de agaváceas ha sido la alternativa para el aprovechamiento y conservación, principalmente de aquellas especies de importancia económica y en peligro de extinción (Domínguez *et al.*, 2008). Desde 1974, existe publicaciones de propagación *in vitro* para ciertas especies del género *Agave* tales como *A. sisalana*, *A. fourcroydes*, *A. atrovirens*, *A.*

tequilana y otras; las cuales han sido estudiadas por su importancia económica en la producción de bebidas alcohólicas y fibra (Madrigal *et al.*, 1990). La bibliografía consultada muestra que el cultivo *in vitro* en especies del género *Agave* se ha logrado a partir de cultivo de meristemos, organogénesis directa e indirecta, o mediante embriogénesis somática (Domínguez *et al.*, 2008).

Se han desarrollado tecnologías para la propagación *in vitro* de plantas de *Agave*, sin embargo, son pocas las especies que se han estudiado, orientándose principalmente al uso hortícola e industrial. La finalidad de esta estrategia es propagar masivamente clones de plantas seleccionadas en campo, que permitan establecer homogeneidad en los cultivos, resaltando las características de interés comercial de las cuales podemos citar la calidad y cantidad de fibra y el desarrollo acelerado de las plantas, entre otras características.

En trabajos reportados como se indica en la tabla 2, se han modificado los medios de cultivo con el fin de propiciar una mejor propagación en *Agave*, como *A. sisalana* y *A. fourcroydes* donde se ha logrado la multiplicación vegetativa por cultivo de meristemos y a partir del cultivo de células aisladas (Robert *et al.*, 1987).

Tabla 2. Reporte de investigaciones en especies de género *Agave*

Espece	Sistema de respuesta morfogénica	Referencia
<i>Agave sp.</i>	Organogénesis Indirecta (formación de Callos)	Groenewald <i>et al.</i> , (1977)
<i>A. fourcroydes Lem.</i>	Organogénesis Indirecta (formación de Callos)	Madrigal-Lugo <i>et al.</i> , (1990)
<i>A. fourcroydes Lem.</i>	Organogénesis Indirecta (formación de Callos) y Organogénesis Directa	Robert <i>et al.</i> , (1987)
<i>A. atrovirens</i>	Organogénesis Indirecta	Madrigal-Lugo <i>et al.</i> ,

	(formación de Callos)	(1990)
<i>A. arizonica</i>	Organogénesis Indirecta (formación de Callos)	Power y Backhaus, (1989)
<i>A. sisalana</i>	Organogénesis Indirecta (formación de Callos)	Harza <i>et al.</i> , (2002)
<i>A. fourcroydes Lem</i>	Embriogénesis Somática	Piven <i>et al.</i> , (2002)
<i>A. sisalana</i>	Embriogénesis Somática	Nikam <i>et al.</i> , (2003)

Groenewald *et al.* (1977) fueron los primeros en lograr la regeneración de plántulas *in vitro* de Agave de forma indirecta, utilizando como explantes embriones de semillas, estos fueron sometidos en el medio Lismaier y Skoog suplementado con 1 mg/l de 2,4-D y 5 mg/l de KIN para la formación de callos. La organogénesis fue obtenida después de 12 semanas en el medio con 0,2 mg/l de 2,4-D.

Powers y Backhaus (1989) regeneraron plantas de *A. arizonica*, a partir de callos derivados de segmentos basales de bulbillos. La inducción del callo, la proliferación de brotes y el enraizamiento fue en el medio MS suplementado con diferentes concentraciones de vitaminas, NaH_2PO_4 y sacarosa, con 1,4 μM de 2,4-D, y para lograr la organogénesis utilizaron 44,4 μM de 6-BAP y 5,4 μM de ANA.

Nikman (1997) realizó estudios con *A. sisalana* a partir de explantes de tallo, de bulbo y rizoma, empleando ANA (0,5 mg/l) más BA (1,5 mg/l) desarrollando callos y de estos regeneraron brotes en medio MS con KIN (0,5 mg/l).

Otro resultado exitoso, fue para el *A. parrasana Berger*, donde se pudieron obtener brotes a partir de callos generados de hojas jóvenes. Esto fue con el uso de BA a 6 y 12 mg/l o con la mezcla de BA (3, 6, 9 y 12 mg/l) y 2,4-D a baja concentración (0,008 mg/l) (Santacruz *et al.*, 1999).

Harza *et al.* (2002) utilizaron rizomas, hojas jóvenes y maduras de *A. sisalana* en tres medios diferentes: MS, MS modificado en la concentración de nitrógeno

y el medio MS con hidrolizado de caseína. En estos medios se utilizó el 2,4-D en concentración de 2 mg/l y KIN con 1 mg/l, dando como resultado una buena formación de callos y para la formación de los brotes utilizaron 6-BAP en 4 mg/l y 6 mg/l.

También se logró desarrollar la organogénesis indirecta en el *A. tequilana*, utilizando explantes de hojas y tejido meristemático, estos explantes fueron extraídos de la parte central de la piña del Agave. La mejor formación de callos se logró con la utilización de la auxina ANA en comparación con el 2,4-D, la diferenciación de los brotes a partir de los callos fue obtenida con 0,25 mg/l y 10 mg/l de 6-BAP. Los brotes fueron enraizados en el medio MS libre de fitorreguladores (Valenzuela *et al.*, 2006).

Debido a las formas de crecimiento de las plantas del género Agave, las estructuras que han sido utilizadas para fines de micropropagación son hojas, tallos, yemas laterales, rizomas o estolones; también existen algunos reportes del uso de estructuras reproductivas (semillas).

La mayoría de las respuestas se han reportado orientadas a la formación de brotes vía organogénesis directa e indirecta, y sólo se encontraron según la tabla, dos reportes hasta la fecha con respuesta de embriogénesis somática y en uno de ellos no hubo evidencias claras del proceso. El uso de reguladores del crecimiento, auxinas y citoquininas, ha sido necesario en la promoción de repuestas morfogénéticas y el medio de cultivo con mayor aplicación en micropropagación de agaves es el medio MS.

Posterior a estos estudios se han logrado numerosos avances en un gran número de especies del género mediante la inducción de organogénesis (directa y/o indirecta) o a través de la inducción de la embriogénesis somática.

Romero (2009) logró la inducción de callogénesis así como la formación de brotes en el Maguey pulquero (*A. atrovirens* Karw. ex. Salm-Dyck) a partir del uso de semillas y base de hojas jóvenes como explantes y de la combinación de diferentes reguladores del crecimiento como BPA, 2,4-D, KIN y ANA. Los mejores resultados en la callogénesis (100%) se lograron mediante el uso de combinaciones de BAP - 2,4-D y KIN - 2,4-D en condiciones de oscuridad. Para

la inducción de brotes Romero, empleó diferentes combinaciones de BAP, 2,4-D y BAP, ANA y KIN y sin reguladores del crecimiento (40% de brotes) en condiciones de luz.

Por otra parte Anaya *et al.* (2010), pudieron inducir la organogénesis indirecta en *A. parviflora* a partir de tejidos de callos de plántulas germinadas en medio de cultivo. En este estudio llegaron a la conclusión que para esta especie, los segmentos de tallo resultan ser mejores explantes que los de hojas y éstos que los de raíz. Además señalan el importante papel de la interacción entre 2,4-D y BAP y la necesidad de no emplear grandes concentraciones del primero ya que reduce la capacidad de inducción de brotes en callos.

Yépez *et al.* (2001) también obtuvieron buenos resultados en propagación masiva de *A. cocui* mediante organogénesis indirecta empleando como explantes segmentos de hojas extraídos de vitroplantas los cuales fueron sembrados en medios MS con diferentes concentraciones de BAP, ANA y 2,4-D. Estos concluyeron que para esta especie el uso de segmentos de hojas además de altas concentraciones de BAP sin auxina permite una exitosa inducción de organogénesis indirecta.

En el caso de Cabuya Azul (*A. americana L.*) y Cabuya Blanca (*Furcrea andina Trel.*), Figueroa (2011) logró obtener un protocolo de micropropagación masiva a partir de ápices caulinares procedentes de rizomas y de plantas en crecimiento y empleando diversas concentraciones y combinaciones de BAP y ANA. Según los resultados finales obtenidos el protocolo de micropropagación resultó viable para *Agave americana L.* pero no para *Furcrea andina Trel.*

A nivel mundial existen numerosos estudios realizados para la micropropagación *in vitro* del henequén (*A. fourcroydes Lem.*) que es una especie de gran valor económico y ecológico por sus diversos usos. En este marco Garriga *et al.* (2010) lograron la formación de brotes axilares con una reducción de la concentración de reguladores del crecimiento empleando como explante ápices con 35 días de establecidos *in vitro*.

También con la misma especie González *et al.* (2002) lograron mediante embriogénesis somática la obtención de callos con estructuras embriogénicas.

Para este estudio se evaluaron diferentes tipos de explantes (hojas, base de hojas de vitroplantas y rudimentos seminales provenientes de ovarios de 2-4 cm de longitud) de los cuales el ápice resultó ser el mejor para la inducción de callos con estructuras embriogénicas.

Debido a que el método convencional de propagación no garantiza con celeridad un volumen elevado de este nuevo material en vista de su evaluación en condiciones de producción comercial, se ejecuta en este trabajo la propagación *in vitro* de dos nuevas accesiones de henequén como vía alternativa de obtención de posturas.

2.5.3.2 Factores que determinan el éxito del cultivo *in vitro*.

Existen diferentes factores que determinan el éxito en los sistemas de micropropagación, entre ellos está el estado fisiológico de la planta que dona el explante, influyendo significativamente en su capacidad morfogénica, por ejemplo los requerimientos nutricionales y hormonales difieren cuando los tejidos cultivados provienen de plantas de diferentes edades fisiológicas (Styer y Chin, 1983). Mientras más joven y menos diferenciado esté el tejido que se va a sembrar, mejor será la repuesta *in vitro*. Los factores físicos juegan un papel determinante; la luz y la temperatura. El papel de la luz en la diferenciación involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperiodo y la calidad, aunque se reconoce la importancia morfo-genética de estos componentes, los estudios realizados con el fin de analizarlos son escasos (Herman, 2000). Los componentes físico-químicos del cultivo de tejidos son también importantes a considerar para el adecuado desarrollo de los cultivos, entre los de mayor importancia están las sales minerales, la sacarosa como fuente de carbono, las vitaminas, aminoácidos, reguladores del crecimiento, pH y antioxidantes (Dodds y Roberts, 1982).

Las investigaciones en diversas especies han permitido la generación de un gran número de medios nutritivos, el más comúnmente usado es la formulación desarrollada por Murashige y Skoog (MS) en 1962 (Tisserat, 1985).

La vía de respuesta morfo-genética, directa e indirecta es un factor importante a contemplar para la estabilidad o inestabilidad genética (Hussey, 1986). Los

procesos indirectos implican una desdiferenciación de los tejidos, protagonizados por una mitosis acelerada que conlleva a una desorganización, originando una masa de células (callo), inducida principalmente por la presencia exógena de reguladores del crecimiento adicionados en el medio. Los cultivos de callo por largos periodos de tiempo, están directamente relacionados con la aparición y presencia de elevados niveles de variación genética, ejemplo; cambios cromosómicos en la estructura y el número cromosómico, en el contenido de DNA y cambios genéticos (Hussey, 1986). Esta inestabilidad puede presentarse de igual forma en plantas generadas de cultivos celulares en suspensión y a partir de protoplastos. Sin embargo, existen ejemplos de inestabilidad genética en plantas generadas de 24 ápices de tallos y meristemos, así como de estabilidad genética en plantas generadas a partir de callos y cultivos en suspensión (Nehra *et al.*, 1994).

Actualmente en Cuba, existe un proceso de recuperación de la industria henequenera, pues el henequén ha demostrado ser una fuente de recursos. Además, la provincia de Matanzas cuenta con la más importante fábrica de sogas y cordeles del país (Radio Rebelde, 2013) lo que representa un potencial a aprovechar junto con las 100 hectáreas que se van a sembrar este año. Es por ello que resurge el desarrollo y fomento de nuevas plantaciones.

A la luz de todo lo antes descrito se reconoce la importancia que representa la propagación *in vitro* de nuevas accesiones de henequén, que al mismo tiempo permite tanto la obtención de un mayor número de plantas con mayor calidad y en un tiempo más corto, como la reducción de los efectos negativos que trae consigo la propagación de una sola variedad justo como se presenta en la situación actual de Cuba.

III. Materiales y Métodos

El trabajo se desarrolló en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas (CEBIO). Esta investigación se ejecutó durante 20 meses desde diciembre del 2012 hasta julio de 2014.

3.0.1 Selección del Material Vegetal

Como material original, se seleccionaron plantas de henequén con una altura entre 40 y 50 cm y un promedio de 50 hojas. Estos materiales se encontraban establecidos en áreas de plantación de uso comercial en la granja Eladio Hernández de la Conchita, los cuales se caracterizaron por mostrar un óptimo estado fisiológico y sanitario. Además fueron seleccionadas plantas de las accesiones Subinerme y Clon 97 las cuales se cultivan en el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Hortícolas Liliana Dimitrova de la Habana. Los hijos de rizomas procedentes de las plantas antes mencionadas son el material con el cual se inició la investigación. Los individuos seleccionados presentaron una altura entre 15 y 20 cm con un promedio de 15 hojas.

3.0.2 Preparación del material vegetal

Las plantas seleccionadas fueron desprovistas de sus hojas más externas y posteriormente lavadas con detergente y dejadas bajo flujo de agua corriente por 15 minutos. Para la desinfección se empleó el esquema que a continuación se desarrolla:

Los fragmentos que contenían el ápice meristemático se sumergieron en etanol (70% v/v) durante 5 segundos que a continuación se flamearon hasta extinción del fuego.

Posterior a este proceso se pasaron por una solución de hipoclorito de sodio (NaClO, 5% v/v) durante 20 minutos, después de lo cual se lavaron tres veces con agua destilada estéril por un período de 10 minutos cada uno. En esta fase se eliminaron las partes dañadas por el cloro con la ayuda de un cuchillo filoso que posteriormente fueron sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio (2.5% v/v) durante 10 minutos. A continuación, se realizaron tres lavados de

igual forma que los primeros, con la diferencia de que estos se efectuaron 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 uso de pinzas finas y bisturí, a fin de eliminar todo lo visualmente dañado por el cloro. El tamaño de los ápices aislados osciló entre 1,5 y 2,0 cm de longitud.

Tras el aislamiento de los ápices, estos se mantuvieron en papel secante hasta el momento de su introducción en el medio de cultivo para así reducir de forma considerable la cantidad de agua y de la misma forma la posible incidencia de agentes contaminantes.

La composición nutricional basal que se empleó fue la recomendada por Murashige y Skoog (1962), con las sales portadoras de Nitrógeno ligeramente modificadas por Robert *et al.* (1992). A continuación se procedió al ajuste del pH del medio a 5,7 empleando HCl (0,1N) antes la esterilización. La sustancia usada para solidificar el medio de cultivo fue el Agar técnico #3 (BioCen). La esterilización del mismo se realizó en autoclave a una temperatura de 121 °C y 1,2 kg.cm⁻² de presión para un tiempo de esterilización que varió entre 15 y 20 minutos en dependencia del volumen de medio en preparación.

3.0.3 Estudios fisiológicos de crecimiento y supervivencia

Para la realización de este trabajo se evaluaron un grupo de variables relacionadas con el crecimiento y la supervivencia para ponderar el comportamiento de las nuevas accesiones con respecto a la variedad Sac ki bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

3.0.3.1. Evaluación del porcentaje de contaminación y supervivencia

Este indicador se obtiene a partir de la expresión en porciento del número de explantes establecidos resultante de la resta entre el total inicial y los establecidos *in vitro* tras eliminar los explantes afectados por la contaminación. Para esta evaluación se trabajó con 4 repeticiones para cada accesión así como para la variedad Sac ki y un número de 20 explantes por repetición.

$$\%_{Contaminación} = \frac{Cantidad_{Ec} \times 100}{Cantidad_{Et}}$$

$$\%_{Supervivencia} = 100 - \%_{Contaminación}$$

Cantidad E_c → Cantidad de explantes contaminados

Cantidad E_t → Cantidad de explantes totales

3.0.3.2 Medición de la masa fresca, seca e incrementos

Para la determinación de la masa fresca se procedió al pesaje de un número de 5 plantas por accesión y de la variedad Sac ki. Al final de la fase de establecimiento se efectuó otro pesaje para obtener así las posibles ganancias en este indicador.

Para la determinación de la masa seca, las plantas seleccionadas después del pesaje fueron dispuestas en una estufa a una temperatura de 60°C por un tiempo que osciló entre 48 y 72 horas (hasta peso constante). Posteriormente estas plantas fueron retiradas y pesadas de nuevo con el objetivo de determinar la masa seca.

$$M_S = M_{AS} - M_{DS}$$

M_S → Masa seca

M_{AS} → Masa antes del secado

M_{DS} → Masa después del secado

La determinación del incremento en masa fresca se logró al pesar el material vegetal antes de su introducción a condiciones *in vitro* (fase de establecimiento) y al salir de las mismas. Posteriormente se utilizó la siguiente fórmula:

$$Inc. MF = MF_f - MF_i$$

Inc. MF → Incremento en masa fresca

MF_f → Masa fresca final

MF_i → Masa fresca inicial

3.0.4 Estudios bioquímicos

Para la realización de los estudios bioquímicos excepto para la evaluación del contenido de clorofila se efectuó la extracción de 1 gr de masa foliar que se maceró en frío con el empleo de 2 ml de buffer de fosfato de potasio (0,5mM) a un pH de 7,0. El macerado se centrifugó a 10 000 rpm a 4°C durante 20 minutos. El sobrenadante se pasó a tubos Eppendorf de 2 ml y se descartó el precipitado. Las muestras se almacenaron en un congelador para su conservación. El número de plantas seleccionadas para la extracción fue de 5 para las variantes (Sac ki, Subinerme y C-97) en estudio con un total de 15 plantas en cada fase evaluada.

3.0.4.1 Determinación del contenido de clorofila a, b, totales y carotenoides

Para esta evaluación 5 plantas fueron seleccionadas para las variantes en estudios y al final de cada una de las fases del cultivo *in vitro*. Posteriormente a las plantas seleccionadas se pesó 50 mg de hojas que se maceraron en 5 ml de etanol al 95 % (v/v). Luego del macerado fueron filtradas por medio de un papel de filtro. Finalizado este procedimiento se efectuó la lectura en un espectrofotómetro (Ultrospect 2000) a las siguientes longitudes de onda: 663nm, 645 nm y 440 nm.

Tras la lectura se procesaron los datos obtenidos en las siguientes fórmulas para la obtención del contenido en clorofila a, b y carotenoides (García y Ortega, 2006).

$$Ca = 12.7 \times A_{663} - 2.69 \times A_{645}$$

$$Cb = 22.9 \times A_{645} - 4.68 \times A_{663}$$

$$C_{a+b} = 20.2 \times A_{645} + 8.02 \times A_{663}$$

$$Cca = 4.695 \times A_{440} - 0.268 \times C_{a+b}$$

3.0.4.2. Determinación del contenido de Carbohidratos totales

La determinación de este indicador se realizó en cada una de las fases del cultivo *in vitro*, o sea, establecimiento, multiplicación y enraizamiento mediante el método del fenol sulfúrico según Mahadevan y Sridhar (1986) citado por (Talukdar, 2012). El número de plantas empleadas para la determinación fue

de 5 por cada variante. Durante la determinación se procedió tomando 100 µl de muestras a las que se le añadieron 100 µl de agua y 200 µl de fenol al 5% (p/v). Posteriormente se añadió 1 ml de ácido sulfúrico al 80% (v/v).

La mezcla se dejó reposar por 10 minutos y luego se agitó vigorosamente para hacer la lectura a una longitud de onda de 490 nm.

El control en este caso estuvo compuesto por 200 µl de agua más 200 µl de fenol al que posteriormente se le aplicó el mismo procedimiento que a las demás soluciones de muestra evaluadas.

Los valores de las lecturas fueron procesados en las fórmulas obtenidas a partir de la curva patrón realizada anteriormente mediante el mismo método del fenol sulfúrico y empleando glucosa (10 mg/ml) como solución estándar.

$$y = 0.3743x - 0.007$$

3.0.4.3 Determinación del contenido de Azúcares Reductores

Al igual que en el epígrafe 3.0.4.2, el contenido de azúcares reductores se determinó en las variantes y durante cada una de las etapas del cultivo *in vitro* según el método del ácido 3,5-dinitrosalisílico o DNS (Sumner, 1921). Para las muestras a evaluar se tomaron 50 µl de las mismas a las cuales se les añadió 950 µl de agua y 0,5 ml del reactivo C. Estas se incubaron durante 10 minutos a 100°C. Finalizado este tiempo, se le adicionó 1,2 ml de agua destilada y se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 546 nm.

En esta evaluación el control estuvo compuesto por 1000 µl de agua al que se le añadió 0,5 ml de reactivo C y se le aplicó el mismo procedimiento posterior a la evaluación.

A partir de los valores obtenidos y mediante el uso de la fórmula de la curva patrón de azúcares reductores obtenida usando glucosa (1mg/ml) como solución estándar, se posibilitó la obtención del contenido de este indicador en cada una de las variantes evaluadas.

$$y = 0.1805x - 0.005$$

3.0.4.4. Determinación del contenido de Proteínas

El método empleado para la determinación del contenido de proteínas fue Bradford (1976) citado por (Bernard *et al.*, 2012) el cual se ha aplicado en cada una de las fases del cultivo *in vitro* así como cada una de las variantes. Para ello, se tomaron 100 µl de muestra a los que se le añadieron 900 µl de Bradford y posteriormente se hizo la lectura a una longitud de onda de 595 nm.

Para el blanco se tomó 100 µl de agua destilada con 900 µl de Bradford para llevar la lectura a cero.

Posteriormente los valores de absorbancia obtenidos fueron procesados mediante la fórmula obtenida a partir de la curva patrón establecida empleando BSA (1mg/ml) como solución estándar. Tal procesamiento permitió obtener el contenido de proteínas solubles en las variantes bajo evaluación.

$$y = 0.0896x + 0.0003$$

3.1 Evaluación del comportamiento de las accesiones Subinerme, C-97 y variedad Sac ki en la etapa de Establecimiento

Con el objetivo de determinar el comportamiento de las variantes a evaluar en la etapa de establecimiento se ejecutó este ensayo. En un diseño monofactorial se determinaron masa seca, incremento en masa fresca, contaminación y supervivencia apareciendo el número de plantas muestreadas en los epígrafes 3.0.3.2 y 3.0.3.1 respectivamente. El medio de establecimiento empleado fue el propuesto en el epígrafe 3.0.2 en presencia de 1,0 mg L-1 IBA y 0,75 mg L-1 BAP.

Además de las determinaciones anteriores se evaluaron el contenido de clorofila a, b, total y carotenos según epígrafe 3.0.4.1; contenido de carbohidratos totales, reductores según epígrafes 3.0.4.2 y 3.0.4.3 respectivamente y el contenido de proteínas (3.0.4.4).

3.2 Evaluación del comportamiento de las accesiones Subinerme, C-97 y variedad Sac ki en la etapa de Multiplicación

La etapa de multiplicación representa el centro de la propagación *in vitro* por la obtención del alto número de plantas durante la misma. El logro de este

objetivo unido a la obtención de plantas de calidad se comprobó con un ensayo donde se evaluaron una serie de indicadores bioquímicos los cuales son presentados en los siguientes epígrafes: contenido de clorofila a, b, total y carotenos (epígrafe 3.0.4.1); contenido de carbohidratos totales, reductores (epígrafe 3.0.4.2 y 3.0.4.3 respectivamente) y contenido de proteínas (3.0.4.4).

3.3 Evaluación del comportamiento de las accesiones Subinerme, C-97 y variedad Sac ki en la etapa de Enraizamiento

La última fase del cultivo *in vitro* representa la etapa donde se complementa la fortaleza y estructura de la planta, garantizando así su bipolaridad y capacidad de transferencia y adaptación a un nuevo ambiente. Para la determinación del comportamiento de las plantas en esta fase se realizaron la misma serie de evaluaciones bioquímicas que en la fase de multiplicación.

3.4 Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó para experimentos con un diseño completamente aleatorio con diferentes repeticiones para cada tratamiento. Los datos se procesaron según paquete STATGRAPHICS Centurion XV versión 15.2.06. En cada análisis se comprobó que la distribución de la población se ajustaba a una distribución normal aplicando la prueba de Bondad de Ajuste Kolmogorov - Smirnov y la Homogeneidad de Varianza mediante las Pruebas de Bartlett.

Para los casos en que los datos cumplieran con los requisitos exigidos se aplicaron los modelos lineales (ANOVA de clasificación simple), prueba de múltiples rango de Duncan para la discriminación de las medias con un 5% de significación. Para los casos que no cumplieran con una distribución normal, se efectuó la prueba de Kruskal-Wallis.

3.5 Análisis Económico

Para la valoración económica del proceso de propagación *in vitro* se determinó el costo unitario de las vitroplantas tomando en cuenta los numerosos recursos que entran en dicho proceso.

Además, el análisis se realizó considerando el cuarto sub-cultivo y a partir de 100 explantes. A estos explantes se le aplicó la tasa de multiplicación (tabla 3)

que determina la cantidad de brotes obtenidos por cada explante. Otros indicadores económicos fueron calculados empleando las siguientes fórmulas:

$$\text{Ingresos (CUP)} = \#_{\text{plantas}} \times \text{Precio}_{\text{venta}}$$

$$\text{Gastos}_{\text{Totales}} = \#_{\text{plantas}} \times \text{Costo}_{\text{unitario}}$$

$$\text{Costo}_{\text{por peso (CUP)}} = \text{Costo}_{\text{total}} \div \text{Ingresos}_{\text{Totales}}$$

$$\text{Ganancias (CUP)} = \text{Ingresos}_{\text{totales}} - \text{Gastos}$$

$$\text{Rentabilidad (\%)} = \frac{\text{Ganancias}}{\text{Costo}_{\text{Total}}} \times 100$$

IV. Resultados y Discusión

Durante los últimos años el cultivo de tejidos ha emergido como una potente herramienta para la propagación de varias especies de Agave, de manera directa o indirecta mediante organogénesis (Santacruz *et al.*, 1999).

La multiplicación exitosa de las accesiones de henequén (Subinerme y Clon 97) por la vía organogénica directa se consolida como una vía alternativa y viable de gran aplicación lo cual permite superar las desventajas que se producen con la propagación sexual por semillas (Piven *et al.*, 2001).

4.0- Evaluación del comportamiento de las accesiones Subinerme, C-97 y variedad Sac ki en la etapa de Establecimiento

El objetivo de esta fase es el establecimiento de cultivos asépticos y viables con los cuales comenzar el proceso de micropropagación lo que favorece un proceso repetible sin riesgo de alta variabilidad (González *et al.*, 2003) o contaminación (Alvarado, 1998).

4.0.1. Indicadores del crecimiento

4.0.1.1. Porcentaje de Contaminación y Supervivencia:

En la figura 3 se observa que en la fase de establecimiento el menor porcentaje de contaminación fue obtenido en las accesiones Subinerme y C-97 con valores respectivos de 11,28% y 18,75%. El mayor porcentaje de contaminación se obtuvo con el henequén blanco (Sac ki) con un 37,5%.

En cuanto al porcentaje de supervivencia, la accesión Subinerme presentó el valor más alto (88,75 %) superando a las accesiones C-97 y Sac ki con valores respectivos de 81,25 % y 62,5 %.

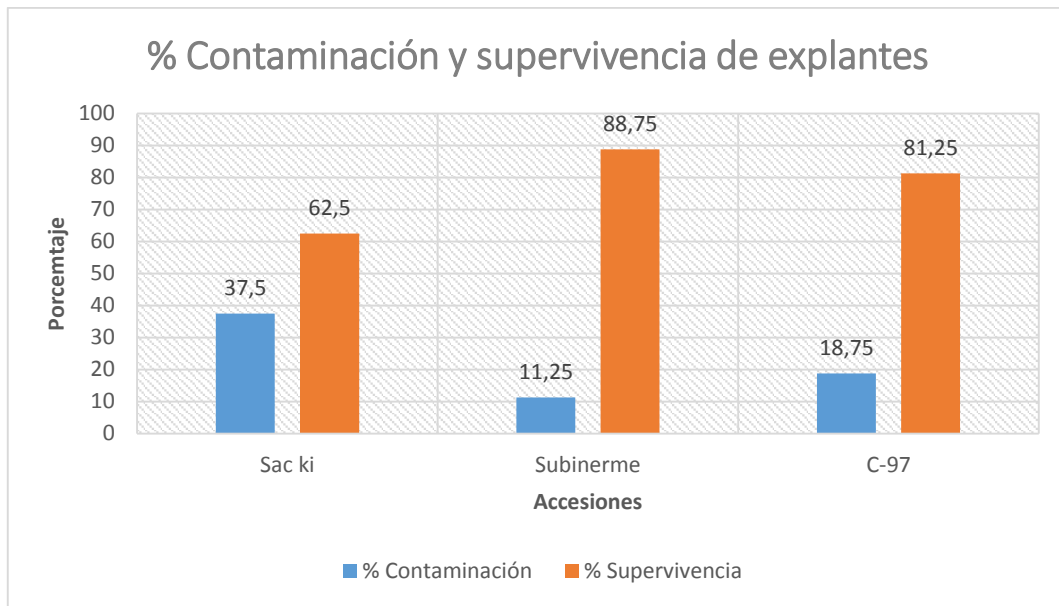


Figura 3. Comportamiento del porcentaje de contaminación y supervivencia en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme).

El procesamiento estadístico de los datos obtenidos en cuanto a contaminación permite observar que no existió diferencia significativa entre las accesiones Subinerme y C-97. En contraparte, estas últimas se diferenciaron de la variedad Sac ki presentando un alto nivel de contaminación.

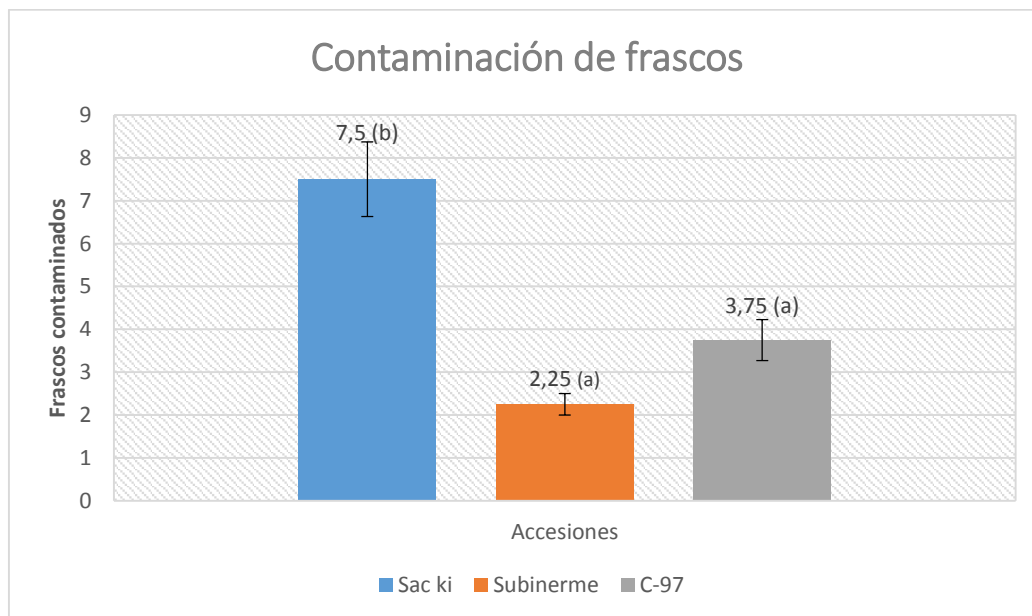


Figura 4. Contaminación de frascos en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Tales resultados representan un importante dato ya que mientras más alto sea el porcentaje de contaminación, más altas resultan las pérdidas por la

necesidad tanto de eliminar los explantes contaminados como por el reemplazo de los mismos.

La contaminación por microorganismos provoca cuantiosas pérdidas en la propagación masiva de plantas y hace ineficientes económicamente muchos procesos. Existen formas para controlar la contaminación, pero es necesario conocer los microorganismos y las fuentes que los introducen (García y Noa, 1998).

Con la reducción de la contaminación por microorganismos no solo se logra el éxito de la fase de establecimiento sino la continuación posterior del proceso de multiplicación.

El hecho de no tener la fuente donadora de explantes en invernadero o condiciones más controladas, no solo afectó la obtención de los explantes sino que impidió tratarlos con fungicidas y bactericidas, lo que repercutió en los resultados en la variedad Sac ki (control) donde se produjo la mayor contaminación dado que los explantes vienen directamente de campos de producción a diferencia de las accesiones que se obtuvieron del banco de germoplasma, donde se produce un mayor control del cultivo.

Estos resultados indican que la implementación del cultivo de tejido en henequén enfrenta grandes dificultades por la contaminación que se produce y más aún en este cultivo que el material vegetal que se utiliza como fuente de explante proviene del campo. Por otra parte se señala que este cultivo se introdujo en Cuba desde 1850 (Carrión, 1988) y desde esa fecha siempre se ha utilizado el mismo material para la propagación sin proceso de saneamiento lo que supone esta elevada contaminación, la cual tiene que ser controlada para lograr un eficiente proceso de micropropagación.

Blanco *et al.* (2004) confirman que cada genotipo requiere de condiciones especiales de desinfección, nutrición y crecimiento para su exitoso establecimiento y posterior manipulación. En este ensayo el factor que más afectó negativamente los resultados fue la procedencia de los explantes que provocó una mayor contaminación y por lo tanto una menor eficiencia del establecimiento o supervivencia.

Según Serrano (1993), una vez desinfectado el material vegetal que se va a utilizar como fuente de explante, resulta muy importante evaluar su crecimiento posterior, ya que los vapores del cloro pueden afectar las capas celulares internas y necrosarlas porque penetran profundamente y aunque por lo general, se obtiene una buena desinfección, también pueden afectar los tejidos internos y darse el caso que el tratamiento utilizado para la desinfección del explante sea efectivo, pero afecte el crecimiento del mismo.

Se observó la ausencia de oxidación principalmente en las accesiones Subinerme y clon 97 lo que permitió a los explantes establecerse más rápido, además con la ausencia de tejido dañado, se evitó que este pudiera ser sustrato para el crecimiento acelerado de bacterias endógenas, sin embargo, este tipo de bacteria fue evidente en un período muy corto de tiempo, en los tejidos fenolizados de la especie control (Sac ki).

De lo anterior, resulta claro observar que hubo una relación directamente proporcional entre el porcentaje de supervivencia y el de contaminación, lo cual indica que el proceso de desinfección fue efectivo en el control de los contaminantes sin dañar los explantes (Figura 5). En otros experimentos, se ha observado que los tratamientos de desinfección son eficientes en el control de la contaminación, pero el daño causado al explante fue letal, tal como el empleo de $HgCl_2$ al 0.5 % (P/V) (Comunicación personal).



Figura 5. Explante sano en fase de establecimiento

En el medio de cultivo utilizado para el establecimiento de los explantes de las tres variantes, en un periodo de 4 semanas se observó un crecimiento activo

de las mismas. Este crecimiento fue favorecido por la ausencia de contaminantes, el cual ayudó a elevar el porcentaje de supervivencia en Subinerme y Clon 97.

Existen numerosos reportes del efecto de los nutrientes (fuentes de nitrógeno), sobre la morfogénesis de plantas *in vitro* donde la respuesta varía no solo entre especies sino entre cultivares de una misma especie (Ávila *et al.*, 1998).

El establecimiento y desarrollo de ápices de bulbillos e hijos de rizomas empleados como explantes fue logrado en las tres variantes ensayadas. El empleo de este tipo de explante en *A. fourcroydes* Lem. fue utilizado con éxito por González *et al.* (2004) para inducir callos embriogénicos. Otros autores (Peña *et al.*, 1997; Garriga *et al.*, 2010) lo emplearon para el establecimiento *in vitro* de brotes y la posterior inducción de la ramificación axilar o adventicia.

Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas es necesario para la formación de plantas a partir de meristemas, ápices o yemas, es decir, inducir la respuesta morfo-genética en plantas superiores (García *et al.*, 2008). Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante. Se considera que si la relación auxina/citoquinina en el medio de cultivo es favorable a la segunda, se favorece la formación de brotes y lo contrario promueve el enraizamiento y la callogénesis. Peres y Kerbauy (1999) encontraron que una alteración en la proporción endógena auxina/citoquinina, la cual favoreció a la citoquinina, influyó fuertemente el desarrollo y diferenciación de plantas bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Usualmente en los meristemas y ápices, la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de establecimiento es generalizada, se utilizan en el medio de cultivo a concentraciones que oscilan entre 0,03-30 mg/L y se ha demostrado su efecto en el crecimiento y morfogénesis *in vitro* (Dixon, 1994).

Lo contrario sucede con las auxinas ya que en las zonas de crecimiento activo los ápices y meristemas que se emplean como material inicial para el cultivo *in*

vitro son los lugares de síntesis y se adicionan al medio de cultivo a concentraciones que oscilan entre 0,001-10 mg/L (Jiménez, 1998). En este ensayo se empleó 1,0 mg L⁻¹ IBA propuesta de Garriga *et al.* (2006) quienes estudiaron la proporción auxina/citoquinina para mejorar la propagación del henequén (variedad Sac ki).

El cambio de las plantas a distintas condiciones (*ex vitro* a *in vitro* o viceversa) trae como consecuencia que estas sean muy susceptibles a diferentes estreses, debido a que no han desarrollado o no han adaptado sus órganos a estas nuevas condiciones, por lo que necesitan responder con nuevas características morfológicas y fisiológicas.

Se concluye que el explante ápice de bulbillo de rizoma y el medio de cultivo empleado fueron los factores que ratificaron que con éstos se alcanzaron resultados exitosos en la supervivencia de las accesiones de henequén; sin embargo con la procedencia de condiciones de plantación comercial del material vegetal control (variedad Sac ki) se indujo resultados negativos por la alta incidencia de la contaminación.

4.0.1.2. Masa Seca e Incremento en Masa fresca

En la figura 6 se puede observar que el mayor incremento en masa fresca se produjo en las dos accesiones (Clon Subinerme y clon 97) las cuales no diferenciaron significativamente entre ellas pero sí de la variedad Sac ki la cual presentó el valor más bajo. Además se puede apreciar un resultado similar en cuanto a masa seca donde las accesiones superan significativamente a la variedad Sac ki.

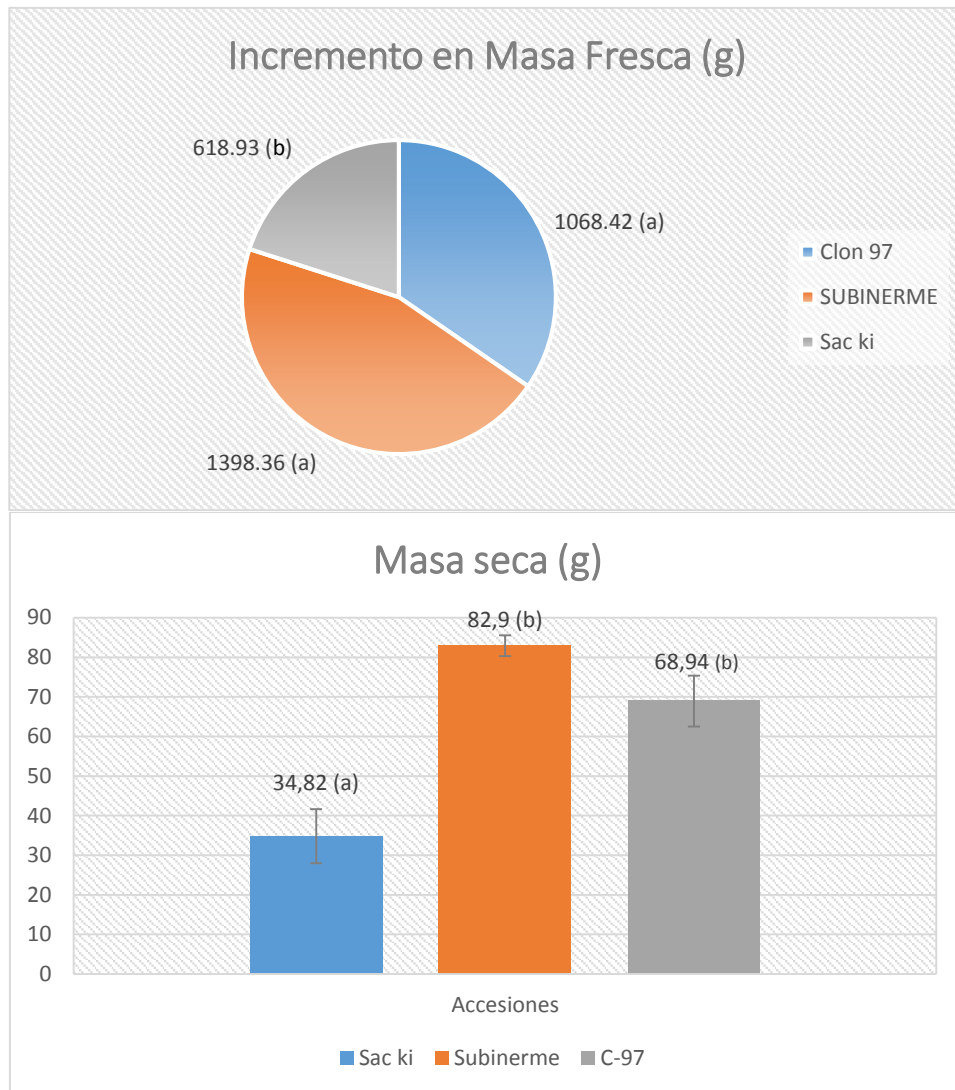


Figura 6. Comportamiento del incremento de la masa fresca y el contenido de masa seca en la fase de establecimiento de las accesiones Subinerme, Clon 97 y la variedad Sac ki. Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

La biomasa vegetal es un buen indicador que algunas veces no es evaluado en detrimento de parámetros de crecimiento de rápida y fácil medición tales como: número de raíces, longitud de las mismas (Watson *et al.*, 2003). Según Abreu *et al.* (2007), esta variable es muy importante pues en muchas ocasiones se evalúan indicadores como área foliar, altura de la planta y número de hojas, los cuales no tienen en cuenta la biomasa producida.

Considerando la variedad Sac ki como el control, los resultados arrojaron que la accesión Subinerme tuvo un incremento en masa fresca del orden de 225,93 % por encima de la misma, seguido de C-97 con un 172,62 %.

Estos resultados sugieren que el genotipo presentó una influencia significativa sobre el desarrollo de los explantes establecidos como se demuestra tanto para el incremento en masa fresca como para la masa seca. Los tallos diferenciados en el clon Subinerme duplicaron su valor en las variables en estudio con relación a la variedad Sac ki y aunque el clon 97 no duplicó sus valores estuvieron cerca.

Vinent y Fajardo (2009) necesitaron de una menor cantidad de hojas para obtener 1 litro de jugo en la accesión 97 (1,40) con respecto al Sac ki con el cual se necesitó de 2 hojas y aún mayor el Subinerme que necesitó el empleo de 3 hojas para la obtención de la misma cantidad. Estos resultados indican que en estas condiciones la accesión 97 fue la que se presentó con mayor masa fresca seguida por la variedad Sac ki y Subinerme respectivamente. En cuanto a la masa seca las accesiones 97 y Subinerme se presentaron con los valores más altos al producir respectivamente 1447 y 1047 g/planta de fibra seca en comparación con la variedad Sac ki que tuvo una producción de 543 g/planta. Ello sugiere la incidencia tanto del genotipo como de las condiciones en las cuales se han desarrollado las diferentes plantas evaluadas. Estos resultados también pueden ser considerablemente influidos por indicadores tales como el ancho de las hojas, la altura de las plantas y el total de hojas por plantas que de forma general han sido mucho más altos en la accesión 97 (12; 53; 80) que en Subinerme (9; 50; 81) y la variedad Sac ki (10; 20; 43)

Esto sugiere que las accesiones presentaron un metabolismo más eficiente pues alcanzaron los mayores valores de masa seca. Se debe señalar la importancia de los valores de masa seca como un indicador de calidad de los explantes establecidos, pues ésta se compone principalmente de lignina y polisacáridos en la pared celular, además de componentes del protoplasma como proteínas, lípidos, aminoácidos, ácidos orgánicos y algunos elementos inorgánicos como el potasio (Castro y González, 2002).

4.0.2. Indicadores bioquímicos

4.0.2.1. Contenido de pigmentos fotosintéticos

La clorofila a, b, total y carotenoides son pigmentos que juegan un papel primordial en la fotosíntesis gracias a su capacidad de captar la luz a diferentes longitudes de onda. Por tal razón la determinación del contenido de estos pigmentos en cada una de las fases puede servir de corolario para la actividad fotosintética de las vitroplantas y en alguna medida de prueba de cambios fisiológicos que tienen lugar a lo largo de todo el proceso además de su capacidad fotosintética que refleja su capacidad productiva de moléculas sumamente importantes para su adecuado desarrollo.

4.0.2.1.1. Contenido de clorofila a:

Se observa en la figura 7 que la evaluación del contenido de clorofila a no indicó diferencia significativa entre la variedad Sac ki y la accesión Subinerme pero sí entre estas y la accesión C-97 que presentó el valor más elevado.

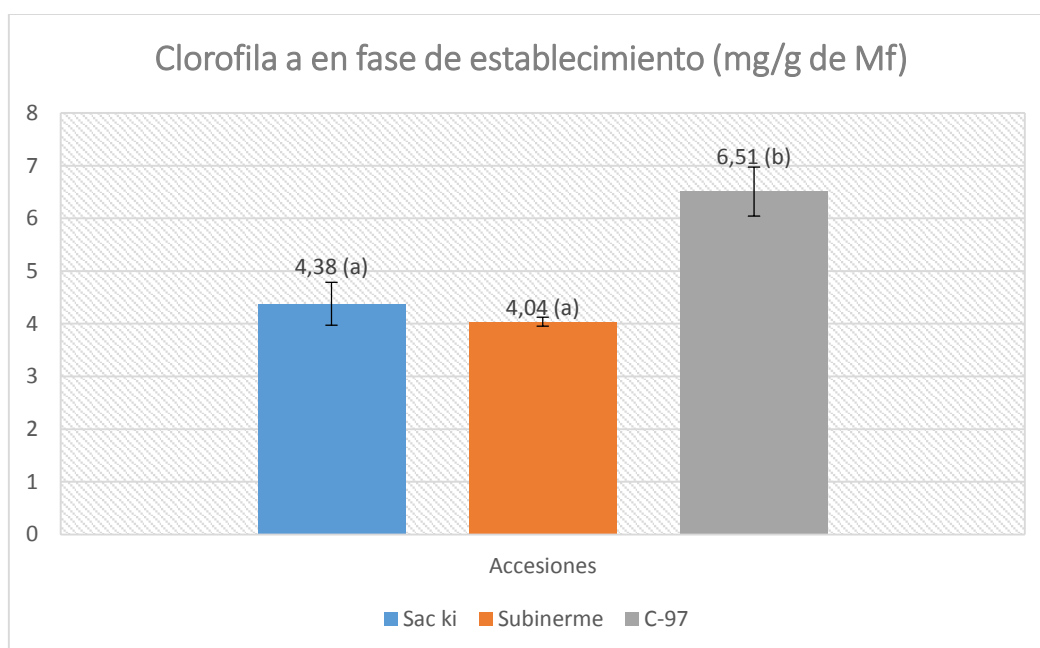


Figura 7. Contenido de clorofila a en fase de establecimiento en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

4.0.1.1.2. Contenido de Clorofila b:

La evaluación estadística para el contenido de clorofila b mostró un comportamiento similar a la de la clorofila a al existir diferencia significativa entre la accesión C-97 que resultó ser la de mayor contenido y las otras variantes evaluados (Sac ki y Subinerme) que no se diferenciaron entre sí (Fig. 8).

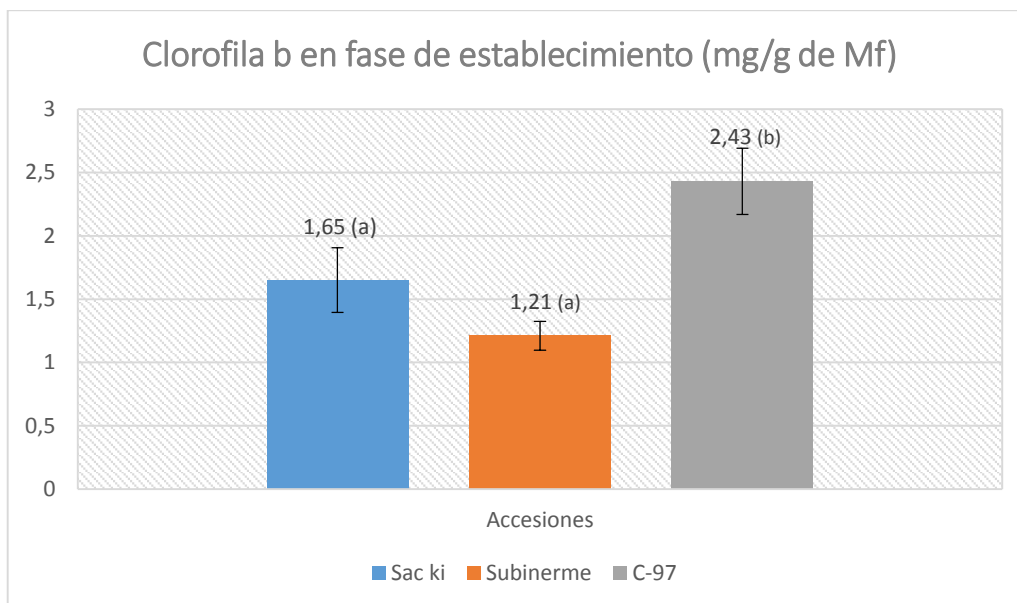


Figura 8. Contenido de clorofila b en fase de establecimiento en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

4.0.2.1.3. Contenido de Clorofila total:

Al evaluar el contenido de clorofila total en los explantes (Fig. 9) se obtuvo que la accesión C-97 se diferenció significativamente mostrando el valor más alto, mientras la variedad Sac ki y la accesión Subinerme no presentaron diferencia significativa entre ellas. Este resultado concuerda con los obtenidos en la evaluación individual de clorofila a (fig. 7) y b (fig. 8).

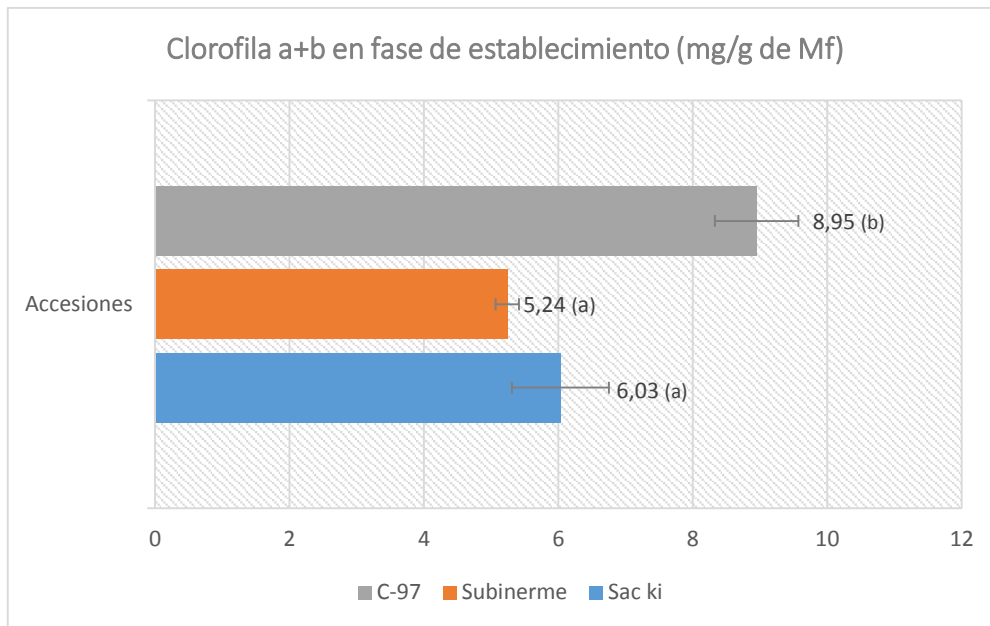


Figura 9. Contenido de clorofila total en fase de establecimiento en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

4.0.2.1.4. Contenido de Carotenoides:

La evaluación del contenido de carotenoides mostró que la accesión C-97 se diferenció de la variedad Sac ki y la accesión Subinerme que no se diferenciaron entre sí. El análisis estadístico de estos datos se observa en la figura 10.

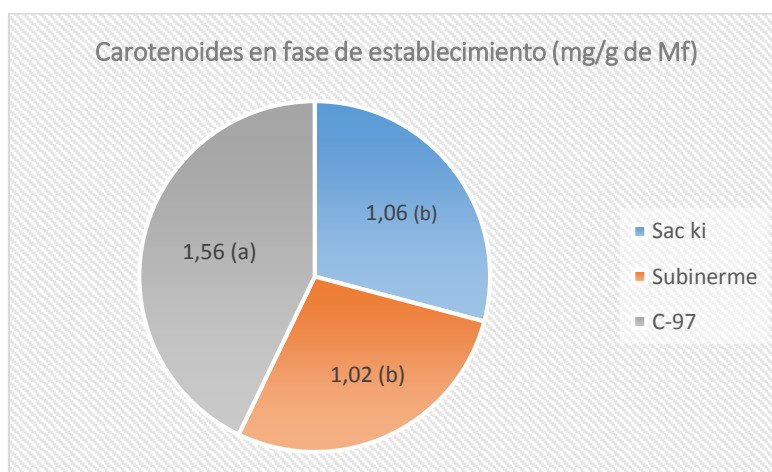


Figura 10. Contenido de carotenoides en fase de establecimiento en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

La fotosíntesis es uno de los procesos bioquímicos de mayor importancia para que las vitroplantas puedan expresar su potencial de crecimiento y desarrollo, aunque esta no ocurre de inmediato al inicio de la fase de establecimiento; pero

para ello existen numerosas sustancias que el medio de cultivo aporta y que contribuyen al desarrollo inicial de las vitroplantas, el posterior desarrollo del sistema fotosintético y finalmente el crecimiento y desarrollo de las mismas. González *et al.* (2007) señalan que el BAP es el biorregulador de crecimiento más efectivo en cuanto a la estimulación de brotes. Se ha observado en un gran número de Agaváceas, que el desarrollo de brotes que posteriormente realizarán la fotosíntesis se obtiene directamente al adicionar al medio de cultivo cantidades relativamente altas de citoquininas y bajas o nulas cantidades de auxinas (Robert *et al.*, 1992). Algunos autores demostraron que la utilización de benciladenina (BA; 10 mg/L) sola o en combinación con auxinas fueron muy efectivas en la formación directa de brotes en varias especies de Agaváceas, entre ellas se encontraban varias especies como *A. shidigera* (Rodríguez *et al.*, 1996); *A. parrasana* Berger (Santacruz *et al.*, 1999); *A. sisalana* (Harza *et al.*, 2002).

En esta investigación la inducción de los brotes se presentó con una coloración verde en el 80% de los explantes, mientras que el 20% restante tuvieron una coloración verde amarillenta y retrasaron el desarrollo de las plántulas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Salazar *et al.* (2009), quien trabajando con *Agave cocui* reportaron que los explantes que presentaron una coloración verde a partir de la segunda semana después de la siembra desarrollaron brotes en un 80%, lo cual es consecuencia de las altas concentraciones de citoquininas. De estas hormonas se han señalado que incrementan el contenido de clorofila a través de la diferenciación de cloroplastos y por consiguiente la capacidad fotosintética; mientras que aquellos que no desarrollan la coloración verde, presentan una coloración café y se necrosan a partir de la segunda semana donde no se recuperan y mueren. Esto significa que la inducción de brotes de coloración verde en un 80% de las plántulas producto de la acción de las fitohormonas, representa el incremento del contenido de clorofila y por ende, de la capacidad fotosintética en esta primera fase del cultivo *in vitro*. Esto también se aprecia en las figuras 7, 8, 9 y 10 donde se destaca la accesión C-97 aunque Subinerme también mostró una buena respuesta fisiológica.

Es conocido que los carotenoides juegan un importante papel en la fotosíntesis porque contribuyen a una mayor eficiencia fotosintética al absorber la luz a longitudes de onda a las que otros pigmentos no pueden. Por su parte, las xantofilas se encuentran en el complejo absorbente de luz además de estar asociados con el centro de reacción del fotosistema II (Robert *et al.*, 2004). También es bien conocido que contribuyen a la fotoprotección mediante la aceptación del triplete clorofila y el singlete oxígeno (Havaux y Niyogi, 1999). La inhibición de la síntesis de carotenoides por varios herbicidas inhibitorios o por la inhibición de la transferencia de electrones desde el fotosistema II por el Diuron, resulta en una rápida decoloración foto-oxidativa de los cloroplastos. La decoloración refleja la pérdida de los enlaces dobles o la destrucción de los carotenoides y ocurre en un orden específico de acuerdo a su actividad (Barry *et al.*, 1990). Es importante notar que el efecto de la deficiencia de carotenoides es más severo que el de los tocoferoles conocidos por ser potentes antioxidantes. Esto pudiera sugerir que los carotenoides son más efectivos que los tocoferoles como antioxidantes de los cloroplastos, o que pudieran sustituir de forma efectiva a estas últimas en plantas con deficiencia de las mismas. Esto concuerda con los resultados obtenidos ya que apoya la teoría del incremento de la efectividad fotosintética de las plantas con mayores contenidos de carotenoides en condiciones *in vitro* para las accesiones y variedad evaluadas. Esto incluye tanto la efectividad fotosintética como la estabilidad estructural de los cloroplastos, efectos que se traducen en explantes mejor establecidos, con mayor fortaleza y coloración más intensa.

4.0.2.2. Contenido de Carbohidratos totales, Azúcares reductores y proteínas solubles

4.0.2.2.1. Proteínas solubles:

El análisis estadístico de los valores de concentración de proteínas solubles permitió observar que la variedad Sac ki con el valor más elevado se diferenció significativamente de las otras que no presentaron diferencia significativa entre ellas (Fig. 11).

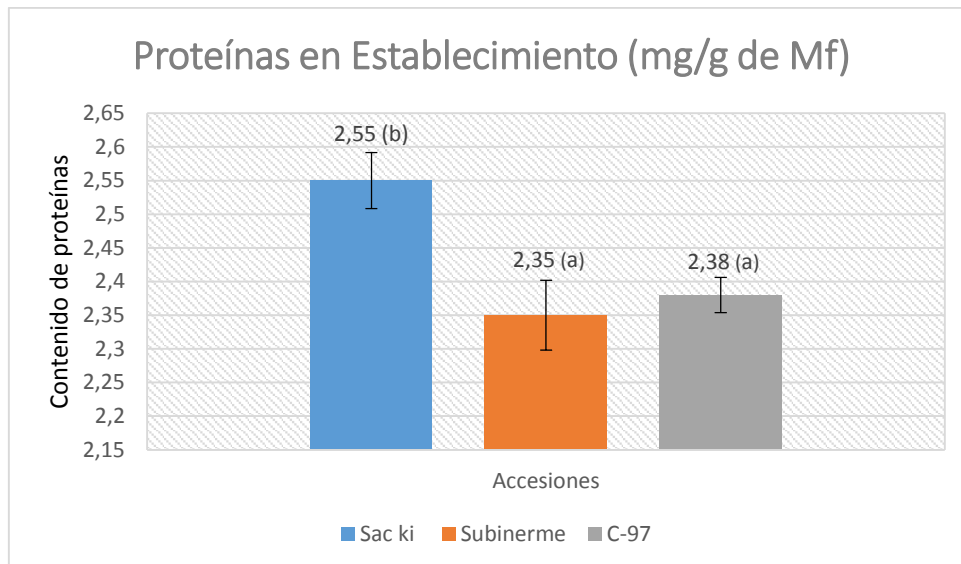


Figura 11. Contenido de proteínas solubles en fase de establecimiento en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Esta diferencia pudiera ser debido a que la reacción de las plantas ante una determinada condición ambiental es diferente entre especies y variedades (Meharg, 1993). La variación en el contenido de proteínas dentro del mismo género es algo común, como lo obtenido por Argente *et al.* (2010) al evaluar 12 variedades de trigo en condiciones de salinidad donde el contenido de proteínas fue muy variable. En contraparte Mata *et al.* (2011) no encontraron diferencia significativa entre *Agave mapisaga*, *A. salmiana* var. *salmiana* y *A. salmiana* var. *ferox* donde los valores fueron relativamente bajos en comparación con otros estudios como el de Baraza *et al.* (2008) que reportan 4,7 % de proteína cruda en *A. salmiana* silvestre y de 5.1 hasta 6,6 % en *A. salmiana*. Sin embargo, Zamudio *et al.* (2009) reportan un $3,4 \pm 0,4$ % de proteína cruda de *A. salmiana*.

La reducción del contenido de proteínas solubles en las accesiones Subinerme y C-97 en comparación con la variedad Sac ki sugieren un mayor uso de las mismas por partes de estas, ya que han presentado un mayor crecimiento. Pero existen trabajos donde se plantea que las condiciones de estrés ambiental afectan adversamente al metabolismo normal de la planta (Bouazizi *et al.*, 2007; Vassilev *et al.*, 2007) y una de sus consecuencias es la reducción del contenido de proteínas totales. Esta reducción se debe a un decremento de su síntesis o a un aumento en su hidrólisis (Perezmolphebaldch *et al.*, 1996). Esto

no ocurre así en nuestras condiciones ya que se puede corroborar con la masa seca así como el incremento de masa fresca que fueron mayores en las accesiones en comparación con la variedad. Esto confirma la teoría según la cual las accesiones tienen una buena respuesta antes el estrés abiótico que sufren en la transición hacia el cultivo *in vitro*. En contraparte, Wang *et al.* (2003) afirman que para sobrevivir al estrés, las plantas acumulan proteínas para proteger las células del efecto del estrés. Esto pudiera justificar el incremento del contenido de proteínas en la variedad Sac ki que al parecer es más vulnerable que las accesiones Subinerme y C-97 a la transición a las condiciones *in vitro*, confirmándose en cierta medida su adecuada adaptación a estas condiciones.

Por el contrario, hay pocos trabajos que reportan un incremento del contenido de proteínas en las plantas bajo condición de estrés ambiental, y en los que se reporta, por ejemplo, la germinación de semillas bajo estrés salino o de humedad, indican que el incremento es aparente a nivel de proteínas en endospermos bajo condición de estrés y que no es el resultado de un aumento de síntesis de proteína (Dubey y Rani, 1990); o en el caso de estrés por metales pesados se obtuvo un incremento en el contenido de proteínas pero solamente en la concentración baja de metal (Hu *et al.*, 2007).

4.0.2.2.2. Carbohidratos totales:

En la figura 12 se puede apreciar que el contenido de carbohidratos solubles totales presentó los valores más elevados en las accesiones C-97 y Subinerme que no se diferenciaron estadísticamente pero sí presentaron diferencia significativa con la variedad Sac ki.

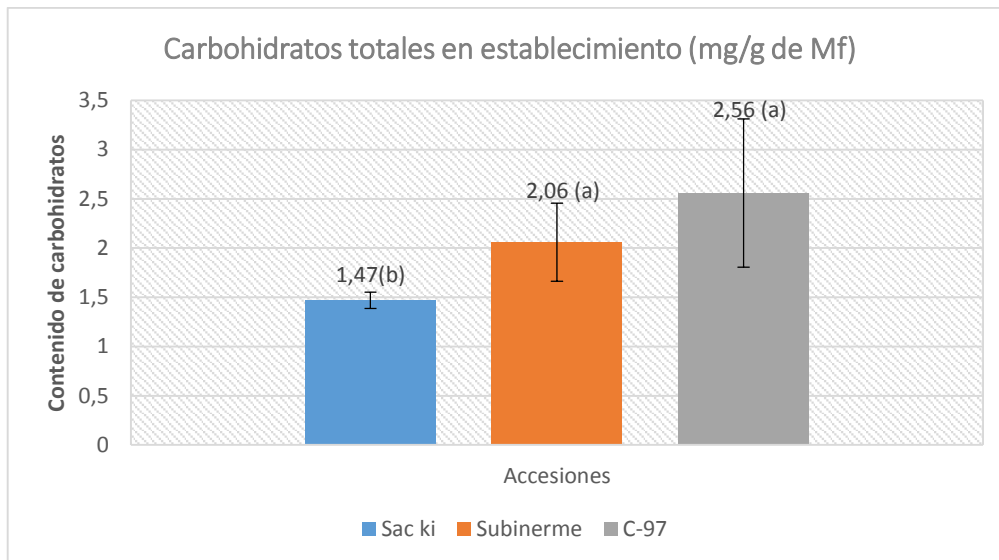


Figura 12. Contenido de carbohidratos totales en fase de establecimiento en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

El bajo contenido de carbohidratos solubles totales en la variedad Sac ki, evidencia una reducida acumulación de esta fuente de energía, lo que repercutió en el proceso de su crecimiento y desarrollo. Por otra parte, este bajo contenido pudiera ser la respuesta a una elevada actividad hidrolítica, la cual no se corresponde con un alto contenido de azúcares reductores cuantificados lo que sugiere una situación estresante dado su comportamiento con relación a la evaluación de los indicadores medidos. Así mismo, otras investigaciones señalan que, en árboles de *Fagus sylvatica* L., las concentraciones de almidón decrecen mientras que los azúcares reductores aumentan durante las defoliaciones o sequías (Beniwal y Hooda, 2011 citados por Martínez *et al.*, 2013).

Como la distribución de azúcares es controlada por las relaciones fuente-demanda, la reserva de carbohidratos se vuelve una parte fundamental para afrontar las condiciones de estrés (Martínez *et al.*, 2013). Esto reafirma la necesidad por parte de las vitroplantas durante las diferentes fases del cultivo *in vitro* de lograr una adecuada distribución de los recursos energéticos mediante el control de las relaciones fuente-demanda en vista de obtener un adecuado crecimiento y desarrollo como se observa en las accesiones Subinerme y C-97 en comparación con la variedad Sac ki.

Los carbohidratos solubles totales presentes en las hojas de los agaves son importantes como reserva de energía, están compuestos principalmente por sacarosa, glucosa, fructosa y en menor cantidad xilosa y maltosa (López y Mancilla-Margalli, 2002). Estos fotoasimilatos juegan un papel importante en el metabolismo intermediario, transferencia y almacenamiento de energía. Cada una de esas funciones es dinámica y la concentración varía grandemente con el estado fisiológico de la planta.

En plantas, la producción de azúcares a través de la fotosíntesis es un proceso vital pues el contenido de azúcar modula y coordina la regulación interna y las señales ambientales que gobiernan el crecimiento y desarrollo (Smeekens, 2000).

4.0.2.2.3. Azúcares reductores:

En esta fase de establecimiento la accesión C-97 con el valor más alto se diferenció significativamente de la accesión Subinerme y la variedad Sac ki que no se diferenciaron entre sí (Fig. 13).

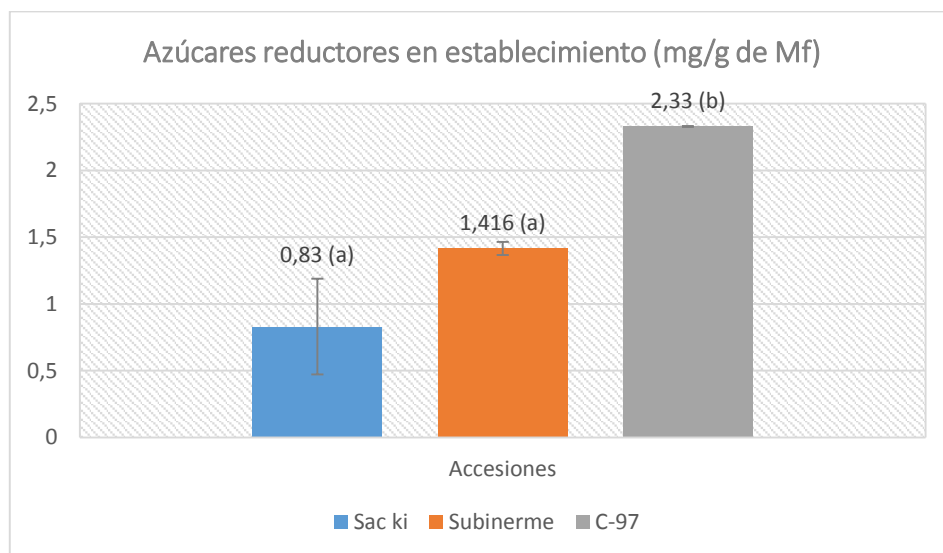


Figura 13. Contenido de azúcares reductores en fase de establecimiento en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Los azúcares son considerados compuestos muy importantes en el metabolismo de las plantas, no solo porque son los primeros complejos orgánicos producidos como resultado de la fotosíntesis, sino que aportan la

mayor fuente de energía respiratoria y se emplean en la protección contra heridas, infecciones, etc.

Actualmente existen ciertas hipótesis sobre el papel protector de los azúcares en plantas sometidas a condiciones de estrés abiótico y estos incluyen aspectos tales como lo siguientes:

- Protección a macromoléculas y estabilización de estructuras membranosas (Bartels y Sunkar, 2005)
- Reducción de procesos de fusión de membranas a partir de la interacción entre grupos polares de los azúcares con las cabezas hidrofílicas de los lípidos de membrana (Bartels y Sunkar, 2005)
- Ajuste osmótico, reservorio de carbono y la eliminación de radicales libres (Parvaiz y Satyawati, 2008)

En esta primera fase del cultivo *in vitro* las vitroplantas se encuentran sometidas a ciertas condiciones de estrés abiótico lo que puede afectar el contenido de diferentes metabolitos entre los cuales se encuentran los azúcares reductores. Las funciones antes mencionadas permitirán tener un mejor entendimiento de la correlación existente entre el contenido de azúcares y la respuesta fisiológica de las vitroplantas bajo las condiciones del experimento. Como se ha señalado, estas se encuentran bajo un cierto estrés abiótico y se ha reportado una fuerte correlación entre la acumulación de azúcares reductores y la tolerancia al estrés en numerosas plantas incluyendo las transgénicas (Taji *et al.*, 2002; Parida *et al.*, 2002). Por lo tanto, esto designa a las vitroplantas con mayores contenidos de azúcares como las de mejor respuesta ante el estrés abiótico. Esto concuerda con lo obtenido ya que las accesiones C-97 y Subinerme presentaron una buena adaptación y un mejor crecimiento aunque esta última no se diferenció significativamente de la variedad Sac ki. Este resultado también coincide con los valores obtenidos de incremento en masa fresca (Fig. 6) en los cuales las accesiones Subinerme y C-97 presentaron valores más elevados y con diferencias significativas en comparación con la variedad Sac ki. Este resultado sugiere que la mayor acumulación de azúcares ha favorecido la resistencia al estrés y promovido un mayor crecimiento.

Numerosos estudios fisiológicos han sugerido que bajo condiciones de estrés los carbohidratos no estructurales (sacarosa, hexosas y polioles) se acumulan aunque con variaciones en dependencia de la especie (Bartels y Sunkar, 2005). Esto explicaría la diferencia entre los valores obtenidos en las accesiones que presentaron valores distintos pero respuestas fisiológicas idénticas por encima de la variedad Sac ki.

El resultado obtenido en la variedad Sac ki apunta a un mayor consumo de los azúcares reductores para favorecer su crecimiento. Esto crea una contradicción debido a que su crecimiento medido mediante la biomasa resultó ser el más bajo mientras tuvo el valor más bajo en cuanto a contenido de azúcares reductores. Esto pudiera ser debido a que las condiciones de estrés a las que estuvo expuesta la variedad han afectado más a su metabolismo que al de las accesiones. Liu *et al.* (2004) han señalado que el estrés abiótico reduce las concentraciones de sacarosa y almidón en las hojas, pero incrementa las concentraciones de hexosas que desempeñan ciertas funciones y permiten lograr un cierto crecimiento tal y como se obtuvo.

4.1-Evaluación del comportamiento de las accesiones Subinerme, C-97 y variedad Sac ki en la etapa de Multiplicación

La aparición de los brotes en la fase de multiplicación se presentó a partir de la cuarta semana posterior a la siembra, mientras que el desarrollo se llevó a cabo conforme los explantes fueron cambiando de color, de verde claro a verde oscuro, lo cual fue un indicador de la inducción y del desarrollo de los meristemas a través de la diferenciación. Este comportamiento posiblemente pueda estar influenciado por factores que determinan el desarrollo de los brotes como pueden ser el explante (genética), el número de yemas presentes en cada explante, así como el balance alcanzado de auxina (AIB) y citoquinina (Bencilaminopurina), hasta lograr la organogénesis completa. El tiempo de inducción concuerda con lo reportado por Garriga *et al.* (2010), quienes trabajaron con henequén (*A. fourcroydes* Lem.) logrando la inducción de brotes de 4 a 5 semanas después de la siembra, cuyas plantas expresaron una organogénesis completa (Fig. 14).

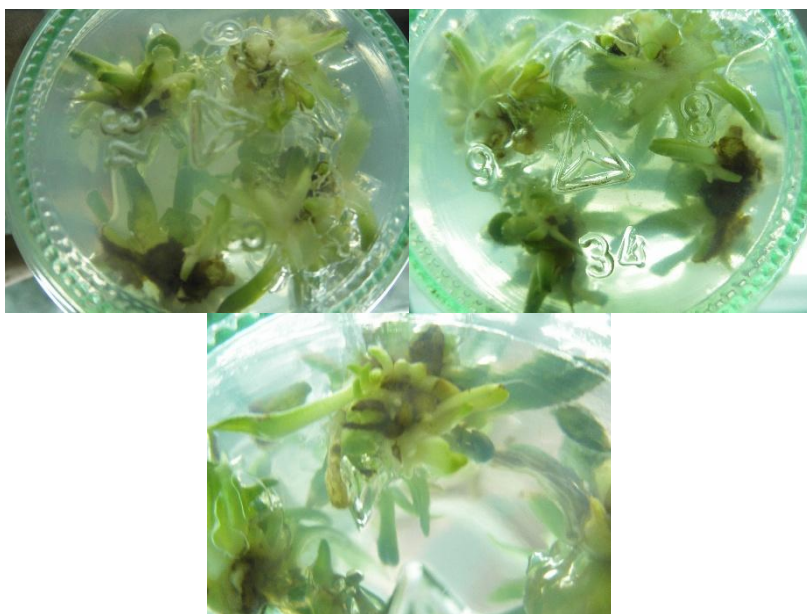


Figura 14. Formación de brotes en accesiones Subinerme (Izquierda), C-97 (Derecha) y variedad Sac ki (Abajo)

Los procedimientos de propagación *in vitro* se consideran técnicas valiosas para la conservación e incremento de la biodiversidad de especies con limitada diversidad como en este caso el henequén (Garriga *et al.*, 2010).

Aunque no fue objeto de estudio se requiere aclarar con relación a la renovación del medio de cultivo y a la tasa de multiplicación, que se encontró que el período de seis semanas fue el óptimo para la multiplicación y separación de los explantes cuya tasa de multiplicación se determinó y se encuentra en la tabla 3. Se constató que este factor varió según la variante lo que sugiere que cada una de ellas tiene una predisposición genética diferente en cuanto a la respuesta del ahijamiento obtenido en condiciones *in vitro*.

Tabla 3. Tasa de multiplicación o factor de brote en las accesiones Subinerme, C-97 y variedad Sac

Variante	Tasa de multiplicación
Sac ki	3,5
Subinerme	5
C-97	4

Domínguez *et al.* (2008), quienes trabajaron con cuatro especies de agave, encontraron que la respuesta a los reguladores del crecimiento difiere de una

especie a otra, por lo que es indispensable desarrollar el protocolo de propagación particular para cada una de ellas.

Los explantes que desarrollaron brotes y presentaron organogénesis, regeneraron en un 100% en plántulas completas. Las plántulas se transfirieron al medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), con las sales portadoras de Nitrógeno ligeramente modificadas por Robert *et al.* (1992) con 0,5 mg.L⁻¹ de AIB y 10,0 mg.L⁻¹ de Bencilaminopurina obteniendo la multiplicación continua, las que conservaron las características fenotípicas de las accesiones y variedad en estudio.

4.1.1. Contenido de pigmentos fotosintéticos:

La evaluación del contenido de clorofila a, b, total y carotenoides en las dos accesiones y en la variedad Sac ki para la fase de multiplicación se presenta en la figura 15.

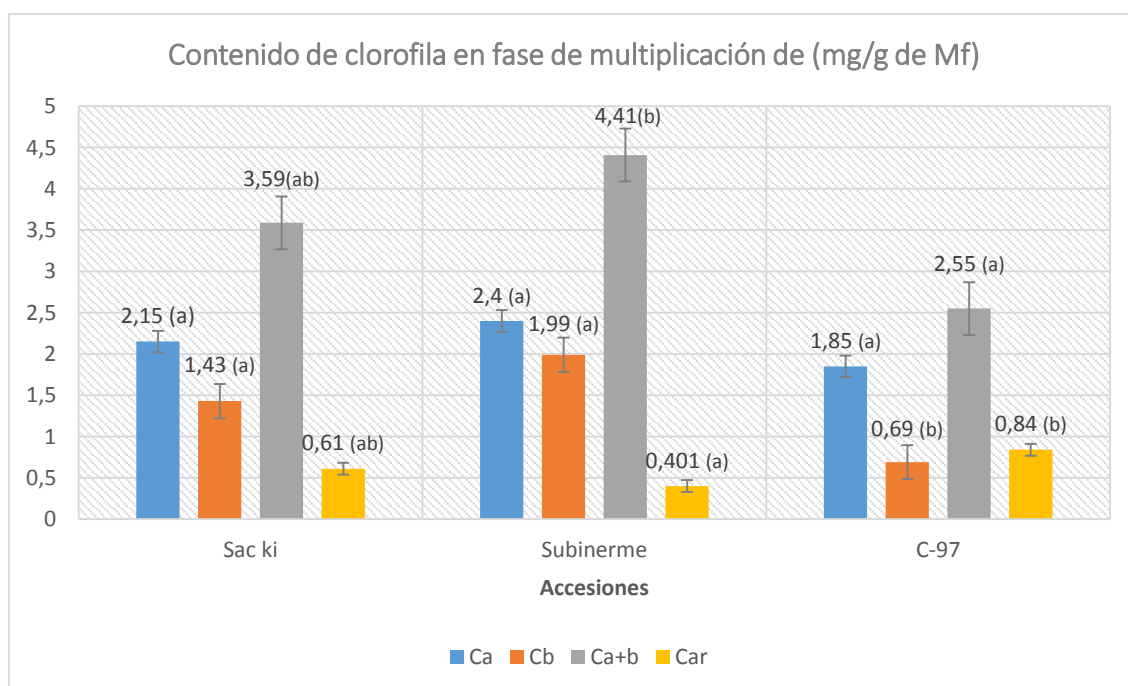


Figura 15. Contenido de Pigmentos fotosintéticos (Clorofila a, b, total y carotenoides) en fase de multiplicación en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Se puede observar que a partir del análisis estadístico de clorofila a, no se obtuvo diferencia significativa entre los explantes evaluados. Así no ocurrió para la evaluación del contenido de clorofila b que si presentó diferencia

significativa entre la accesión C-97 y los demás explantes (Sac ki y Subinerme) que no se diferenciaron entre sí.

Para el contenido de clorofila total, la accesión Subinerme no presentó diferencia significativa con la variedad Sac ki pero esta sí se diferenció significativamente de la accesión C-97 que a su vez no diferenció de Sac ki.

Al evaluar el contenido de carotenoides se obtuvo que la accesión C-97 produjo la mayor cantidad de este indicador además de presentar diferencia significativa con la accesión Subinerme, la cual no se diferenció de la variedad Sac ki. A su vez C-97 no presentó diferencia significativa con la variedad Sac ki.

Es conocido que las condiciones ambientales y nutricionales durante el crecimiento de las plantas pueden influenciar la diferenciación celular, resultando en adaptaciones anatómicas y fisiológicas (Da Silva *et al.*, 2013). Además, las condiciones ambientales y la disponibilidad de nutrientes pueden también influir en los contenidos de clorofila a y b, alterando la relación clorofila a/b e influyendo en la eficiencia fotosintética (Zhang *et al.*, 2006, 2008 citado por Da Silva *et al.*, 2013).

En este estudio tales adaptaciones en las accesiones y variedad han ocurrido de diferentes formas y se han traducido en resultados que se reflejan en la figura 6. Se destaca que las accesiones Subinerme y C-97 presentaron un mejor comportamiento de forma general con respecto a la variedad Sac ki. Además, estas accesiones tuvieron una mayor producción de biomasa lo que confirma la eficiencia de su actividad fotosintética junto con otros procesos. No obstante a ello, la clorofila a se mantuvo estable entre las variantes evaluadas. Para entender tal situación se hace referencia a lo planteado por Costa *et al.* (2001) citados por Da Silva (2013) quienes plantean que la estabilidad del contenido de clorofila en plantas pudiera estar parcialmente relacionado con el llamado punto de maduración fotosintético, a partir del cual los niveles de clorofila no cambian.

Cabe destacar que a pesar de que la accesión C-97 presentó el más bajo contenido de clorofila b y el más alto de carotenoides y que a su vez produjo

una biomasa que no se diferenci6 de la variedad Subinerme, reafirma la eficiencia de los pigmentos accesorios dentro del sistema fotosint6tico. Esto se pone de manifiesto en el estudio realizado por Zhang *et al.* (2006, 2008) donde la reducci6n de la relaci6n clorofila a/b en plantas bajo sombra fue atribuida a un incremento en la producci6n de pigmento accesorio b, el cual es sumamente importante para la optimizaci6n de la eficiencia del fotosistema II bajo condiciones de sombra o estr6s (Koike *et al.*, 2001).

La habilidad de una planta para adaptarse din6micamente a diferentes ambientes de luz est6 generalmente determinada gen6ticamente. El rendimiento fotosint6tico de las hojas est6 relacionado con la radiaci6n, haciendo posible el incremento de la producci6n fotosint6tica de las plantas mediante el incremento de la exposici6n a la luz (Lin y Hsu, 2004). Esto se aprecia en los resultados obtenidos donde la diferencia en el contenido de pigmentos pudiera estar dada por el componente gen6tico de cada una de las variantes en estudio, reflej6ndose as6 en el crecimiento y desarrollo diferencial de cada uno de ellos.

4.1.2. Contenido de Carbohidratos totales, Az6cares reductores y Prote6nas solubles

4.1.2.1. Prote6nas solubles:

Al realizar la evaluaci6n del contenido de prote6nas solubles se obtuvo que no hubo diferencia significativa entre ninguno de las variantes evaluadas (Fig. 16).

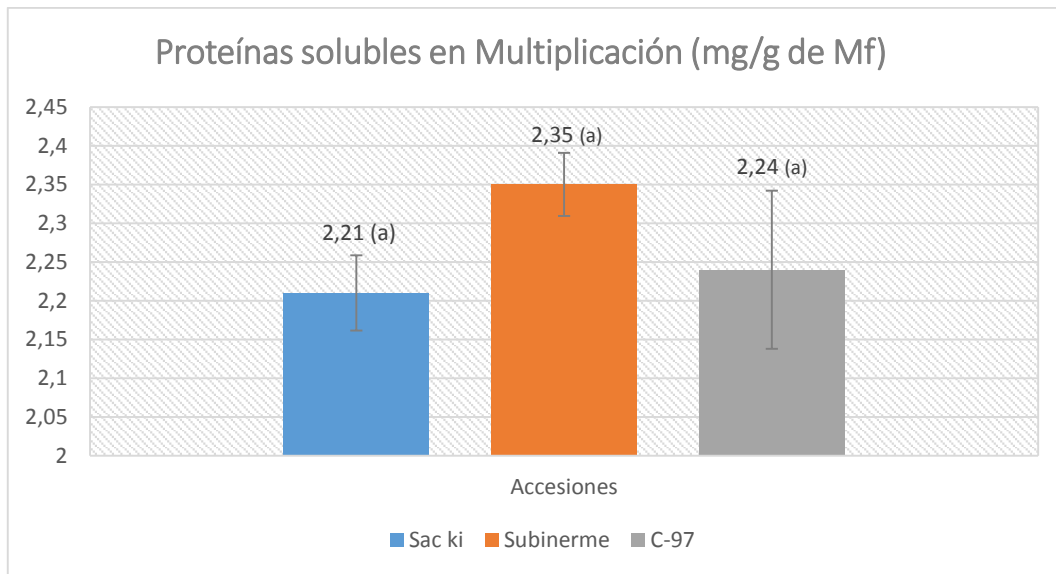


Figura 16. Contenido de proteínas solubles en fase de multiplicación en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Las proteínas son los principales constituyentes de todos los organismos vivos en el planeta (Bariya y Pandya, 2014). Estas son importantes macromoléculas que participan en todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Entre otros procesos, las proteínas están involucradas en la catálisis de reacciones bioquímicas (donde participan las enzimas), el transporte a través de membranas, la estructura celular, la generación de energía y el transporte de electrones, solo por mencionar algunos ejemplos. Las plantas presentan un menor contenido de proteínas en comparación con los animales y esto se debe a que los carbohidratos estructurales (celulosa) componen la mayor parte de la estructura de las plantas (Nissen *et al.*, 2004).

El comportamiento de las variantes evaluadas en cuanto a contenido de proteínas ha variado en esta fase en comparación con la fase de establecimiento resultando en una mayor estabilidad de las mismas de forma general. Así la accesión Subinerme mantuvo el mismo valor obtenido en la fase anterior lo que no ocurrió con la accesión C-97 y variedad Sac ki que tuvieron un ligero descenso aunque significativo en esta última. Esto expresa por lo tanto que después de transitar por la fase de establecimiento, ya estas tres variantes adquieren una cierta adaptación y adoptan un comportamiento similar en cuanto al contenido de proteínas. En el acápite anterior relacionado con este indicador se resaltó la normalidad en la obtención de diferentes contenidos de

proteínas dentro del mismo género; no obstante a ello, el comportamiento de este indicador fue diferente en esta fase.

El decremento obtenido en Sac ki y C-97 es analizado de diferentes maneras por los autores. Así Munns *et al.* (1979) añadieron que aunque el decremento del contenido de proteínas es encontrado en plantas estresadas, la hidrólisis neta de proteínas pudiera no ocurrir y la planta continuaría su crecimiento activo tan pronto como el estrés fuese eliminado. No obstante, normalmente las vitroplantas ya no se encuentran en condición de estrés en esta fase ya que la adaptación ocurrió en la fase anterior. Por ello, se atribuye la disminución del contenido de proteínas a su uso para el crecimiento así como las diversas funciones que desempeñan las mismas en el metabolismo de las plantas. Esto se observó en las vitroplantas que presentaron un crecimiento rápido y vigoroso, sobretodo en la accesión Subinerme (Fig. 17) que presentó una mayor proliferación e importante ahijamiento seguido por la accesión C-97 (Fig. 18) y la variedad Sac ki (Fig. 19). Lo mismo sucedió con Mahmood *et al.* (2011) que obtuvo un bajo contenido de proteínas en la propagación *in vitro* de la orquídea *Oncidium taka*, el cual no implicó la alteración del crecimiento. El mismo autor señaló que los bajos contenidos de proteínas pudieran ser debido a la alta utilización de las proteínas para incrementar el crecimiento y formación de brotes.



Figura 17. Vitroplantas de la accesión Subinerme en fase de multiplicación



Figura 18. Vitroplantas de la accesión C-97 en fase de multiplicación



Figura 19. Vitroplantas de la variedad Sac ki en fase de multiplicación

4.1.2.2. Carbohidratos totales:

El análisis estadístico del contenido de carbohidratos totales en la fase de multiplicación (Fig. 20) mostró que no hubo diferencia significativa entre las variantes evaluadas.

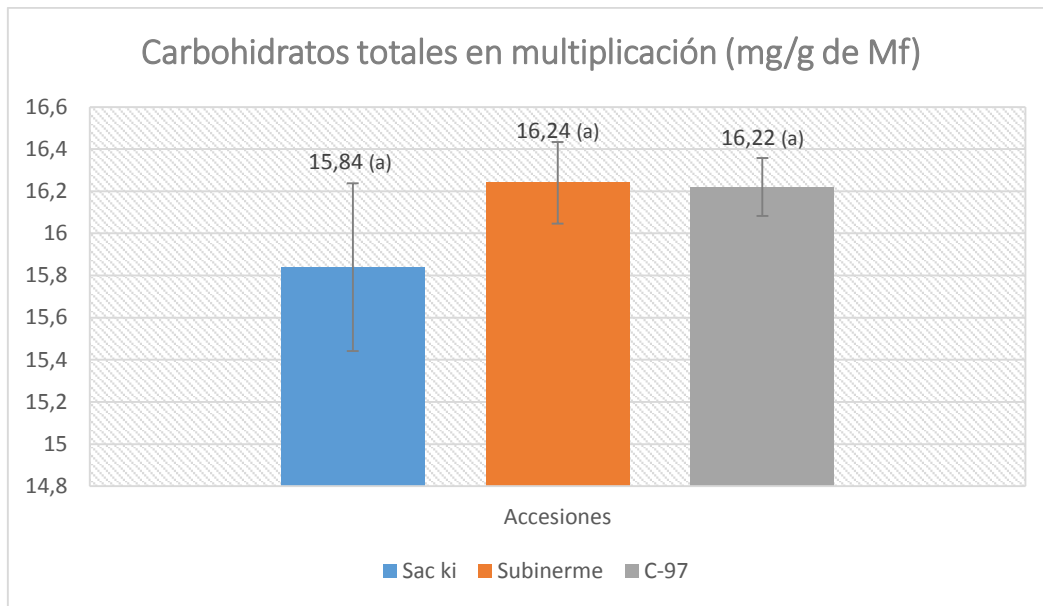


Figura 20. Contenido de carbohidratos totales en fase de multiplicación en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Los carbohidratos están divididos en cuatro grupos químicos conocidos como monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos. En general los monosacáridos y disacáridos, son los de menor tamaño (menor masa molecular), comúnmente conocidos como azúcares (Kadam *et al.*, 2011). La acción de estos compuestos ha sido evaluada y analizada en este experimento.

La concentración de carbohidratos, producto de la fotosíntesis, varía de acuerdo con las condiciones ambientales y las etapas fenológicas (Martínez *et al.*, 2013). La fase de multiplicación que representa la más larga del proceso de micropropagación, por la búsqueda del rápido incremento del número de vitroplantas, presenta la característica de posibilitar en las mismas una mayor acumulación de metabolitos en una fase donde existe un mayor desarrollo fisiológico así como un mejor funcionamiento del complejo fotosintético. Esta diferencia de acumulación de carbohidratos entre las dos fases se puede observar en las figuras 12 y 20.

Recordando que los carbohidratos son los productos principales de la fotosíntesis, considerados fuente de energía (Pallardy, 2008), los resultados obtenidos concuerdan con lo alcanzado en la evaluación del contenido de pigmentos fotosintéticos en esta fase, donde de forma general hubo una eficiencia del aparato fotosintético traduciéndose en la mayor síntesis y

acumulación de carbohidratos. Esto también se refleja en el crecimiento durante esta fase donde las accesiones Subinerme (Fig. 17) y C-97 (Fig. 18) presentaron una mayor proliferación con plantas de mayor vigor que la variedad Sac ki (Fig. 19). Es primordial el contenido de carbohidratos en las vitroplantas para el adecuado seguimiento de la micropropagación dado que de estos dependen procesos como la reproducción, defensa, mantenimiento, almacenamiento y crecimiento (Lilly, 2001).

Por otra parte, Taiz & Zeiger (2006) señalaron que el crecimiento de los árboles urbanos, impulsados por la fotosíntesis, se realiza en presencia de dióxido de carbono, agua, oxígeno y luz solar. El producto de esta reacción química es la glucosa, un carbohidrato simple que posteriormente se asocia con la fructosa para formar un disacárido comúnmente conocido como azúcar de mesa (sacarosa) o en azúcares complejos de almacenamiento como el almidón. Según este autor una reducción en el nivel de almidón a inicios del crecimiento intensivo, no sólo ocasiona un cambio en el metabolismo de los carbohidratos sino también afecta procesos fisiológicos como la fotosíntesis y respiración. Esto no ocurre en las accesiones evaluadas donde los elevados niveles de carbohidratos suponen un adecuado almacenamiento para su posterior uso.

Percival *et al.* (2011) plantean que la concentración de los carbohidratos puede variar dependiendo de las condiciones ambientales; por ejemplo, el almidón y los azúcares simples pueden disminuir como respuesta a las condiciones de estrés hídrico, altas temperaturas o plagas. Siguiendo esta idea el menor contenido de carbohidratos en la variedad Sac ki no pudiera estar relacionado por una respuesta de la planta ante una situación de estrés que se traduce en la hidrólisis de los mismos para la obtención de azúcares reductores como respuesta. No obstante, existe una cierta contradicción ya que la teoría del incremento de la actividad hidrolítica de los carbohidratos supone un incremento en el contenido de azúcares reductores que resultó ser el más bajo en comparación con las accesiones, además de que las plántulas ya no se encuentran en condición de estrés debido a que se logró su adaptación en la fase de establecimiento. Esto lleva a suponer que el menor contenido de carbohidratos pudiera estar relacionado con el simple potencial genético de la variedad Sac ki antes estas condiciones.

4.1.2.3. Azúcares reductores:

El contenido de azúcares reductores para las tres variantes evaluadas durante esta fase de multiplicación presentó diferencia significativa entre la variedad Sac ki con el valor más bajo y las accesiones Subinerme y C-97 que no se diferenciaron entre sí. El valor más alto fue alcanzado por la accesión C-97 (Figura 21).

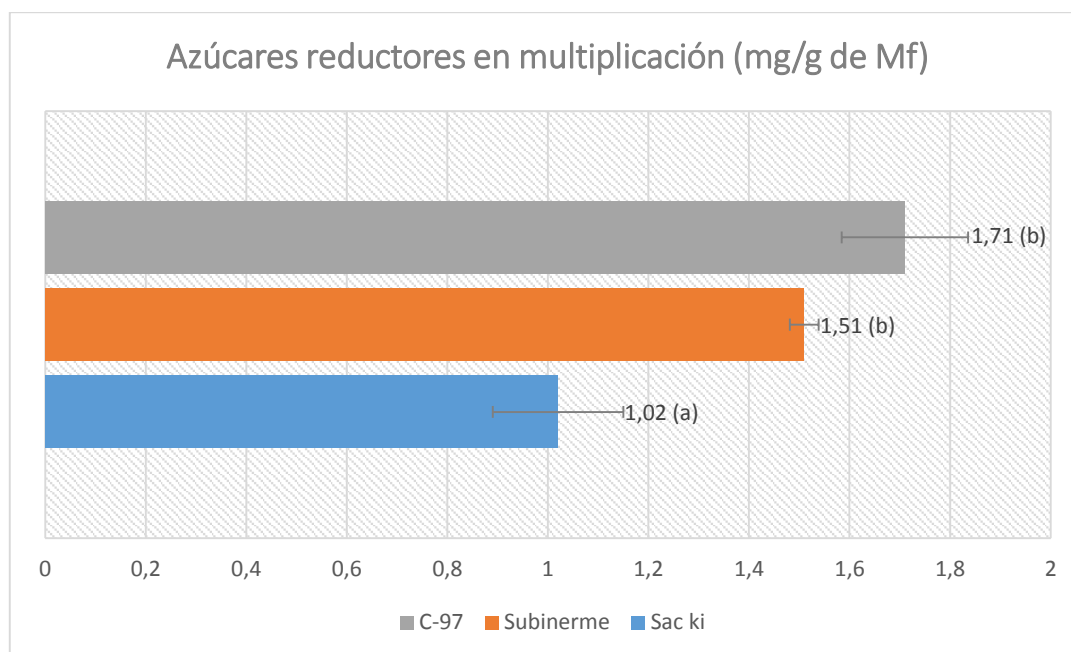


Figura 21. Contenido de azúcares reductores en fase de multiplicación en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0,05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Según los resultados obtenidos, las accesiones Subinerme y C-97 presentaron los valores más elevados de azúcares reductores. Esto sugiere que las accesiones tendría un mayor crecimiento al usar estos metabolitos; lo que concuerda con lo obtenido ya que las mismas en esta fase presentaron un mayor crecimiento en comparación con la variedad Sac ki. Esta última presentó el menor contenido de azúcares con el menor crecimiento lo que sugiere que hubo una alteración de la actividad de las enzimas amilolíticas o una menor producción de esta metabolito en comparación con las accesiones.

Generalmente el contenido de azúcares reductores se atribuye a su uso para el crecimiento o al incremento o decremento de la actividad de las enzimas amilolíticas por diferentes razones. Mohamed (1986) sugirió que la acumulación de azúcares reductores en hojas de plantas de tomate se debió a

la presencia de metales pesados como Mn, Zn, Fe, los que estimularon la actividad amilolítica y como resultado condujo a un incremento de azúcares solubles más que de polisacáridos. De manera similar Trouvirie *et al.* (2003) y Bartels y Sunkar (2005) reportaron que la acumulación de azúcares simples como glucosa y fructosa está dada por un incremento en la actividad de las enzimas hidrolíticas como la α y β amilasas, hechos que fueron corroborados por Zeid (2004).

La acumulación de azúcares está muy relacionada con la interacción de procesos de síntesis y degradación de la sacarosa (Zhu *et al.*, 1997). Debido a que la capacidad de síntesis se hace mayor que el gasto de azúcares en los procesos de respiración y crecimiento, se produce una acumulación del exceso de azúcares formados (Borroto *et al.*, 2003). Esta relación entre síntesis y consumo representa la esencia misma del contenido de azúcares en cada uno de las variantes analizadas. Así Pandey y Singh (1989) reportaron un pequeño incremento en azúcares totales y azúcares reductores en plantas de papaya crecidas en condición *in vitro* lo cual es además apoyado por el trabajo de Swartz (1981) en fresa. Estos estudios se correlacionan con lo obtenido por Zaman *et al.* (1997) en el estudio del rendimiento de vitroplantas de morera.

Cada variante en condiciones *in vitro* tiene su propia característica en cuanto a su capacidad de sintetizar o acumular diferentes metabolitos y en este sentido Seth y Sarin (2012) plantearon que las células de vitroplantas acumulan más azúcares debido a su mayor disponibilidad en los medios de cultivo además de que estas células están en una fase de alta proliferación, razón por la cual acumulan más metabolitos primarios que metabolitos de reserva (almidón o lípidos) y metabolitos secundarios. Esta característica de las vitroplantas pudiera manifestarse de una mayor o menor forma según la variante, lo que es el caso de esta investigación con diferentes contenidos. Existen otros estudios donde esta característica no resulta en una diferenciación del contenido de azúcares como Borroto *et al.* (2003) que evaluó el contenido de azúcares en cuatro diferentes variedades de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) las cuales no presentaron diferencia significativa.

4.2-Evaluación del comportamiento de las accesiones Subinerme, C-97 y variedad Sac ki en la etapa de Enraizamiento

Durante esta fase las vitroplantas de forma general presentaron un comportamiento similar en cuanto al enraizamiento (Fig. 22 y 23) que se logró de forma exitosa tanto en las accesiones como en la variedad Sac ki. No obstante, existió cierta variación en los diferentes parámetros bioquímicos, los cuales son analizados a continuación.



Figura 22. Vitroplantas en introducción a la fase de enraizamiento



Figura 23. Vitroplantas enraizadas

4.2.1. Contenido de pigmentos fotosintéticos:

La evaluación del contenido de clorofila a, b, total y carotenoides en las dos accesiones y variedad Sac ki para la fase de enraizamiento se encuentra en la figura 24.

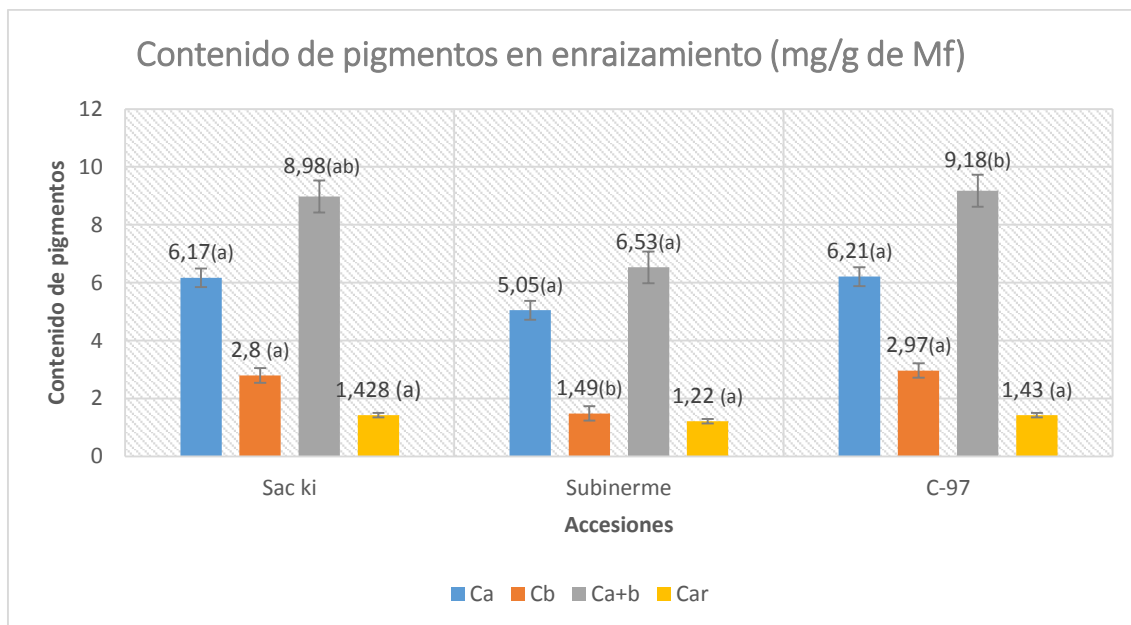


Figura 24. Contenido de pigmentos fotosintéticos (Clorofila a, b, total y Carotenoides) en fase de enraizamiento en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

El análisis estadístico de clorofila a permite observar que no se obtuvo diferencia significativa entre la variedad Sac ki y las accesiones evaluadas presentando la accesión Subinerme el valor más bajo.

El comportamiento no fue similar para la evaluación del contenido de clorofila b que sí presentó diferencia significativa entre la accesión Subinerme con C-97 y la variedad Sac ki que no se diferenciaron entre ellas.

Para el contenido de clorofila total, se obtuvo que la variedad Sac ki no presentó diferencia significativa con las accesiones C-97 y Subinerme las cuales se diferenciaron entre ellas.

La evaluación del contenido de carotenoides mostró que no existió diferencia significativa entre las accesiones evaluadas y la variedad Sac ki.

Las plantas tienden a responder de forma morfológica y fisiológica a las condiciones ambientales en las que se desarrollan (Townsend y Hanover, 1972), modificando la velocidad de crecimiento, la producción de estructuras secundarias y la cantidad de pigmentos entre otras características (Cambrón, 2011). El cultivo *in vitro* se desarrolla en presencia de grandes cantidades de una fuente de carbono orgánico, normalmente sacarosa, una baja densidad de

flujo fotónico, una alta humedad relativa, en frascos cerrados y un ambiente relacionado con un crecimiento heterotrófico o mixotrófico (Galzy y Compan, 1992 citados por Carvalho *et al.*, 2001). Estas condiciones nutricionales y físicas son responsables de las características de las hojas *in vitro*: anatomía anormal y pobre desarrollo de las granas (Wetzstein y Sommer, 1982) así como una baja tasa fotosintética (Chaves, 1994). También pueden ser afectados procesos bioquímicos debido a que la baja actividad y cantidad de Rubisco (Grout, 1988) ha sido relacionada con altos contenidos de azúcares en la media, conocido por causar una represión de productos finales de algunas enzimas fotosintéticas (Koch, 1996).

Sin embargo, las vitroplantas heterotróficas o fotomixotróficas son potencialmente capaces de desarrollar un aparato fotosintético funcional (Tichá *et al.*, 1998) y apreciables índices fotosintéticos (Van Huylenbroeck *et al.*, 2000). Esto se refleja en los resultados obtenidos ya que las vitroplantas presentaron una estabilidad general en la producción de pigmentos así como la actividad fotosintética de las mismas (Figura 24).

Las tres variantes presentan en esta fase una mayor estabilidad de la actividad fotosintética y esto pudiera estar estrechamente relacionado con la habilidad adquirida por los sistemas fotosintéticos de las mismas en el uso eficiente y complementario de sus diferentes pigmentos. Es conocido que la clorofila a es el pigmento principal que transforma la energía lumínica en energía química, la cual se utiliza en el crecimiento de las plantas, por lo que se considera un pigmento activo, mientras la clorofila b se considera un pigmento accesorio y forma parte de las antenas colectoras (García *et al.*, 2006). Por otra parte, la disminución en la intensidad de la luz reduce la actividad fotosintética y la concentración de clorofila b tiende a ser mayor, afectando la relación de clorofila a/b dentro de la planta (Shafiqur, 2000). Esta relación clorofila a/b que es empleada como indicador de estrés (Cambrón *et al.*, 2011) presenta un valor alto según los resultados obtenidos ya que la actividad de la clorofila a se mantuvo por encima de los pigmentos accesorios. Ello indica que durante el experimento, existió una adaptación de las variantes a las condiciones *in vitro* permitiendo una eficiente fotosíntesis y por ende un buen crecimiento. No obstante a ello, cabe señalar la existencia de una cierta plasticidad

fotosintética, por la activación de los pigmentos accesorios clorofila b y carotenoides cuya actividad se incrementa en momentos de baja intensidad lumínica (Shafiqur, 2000). Estos, al absorber y transferir la energía, proporcionan una mayor eficiencia fotosintética lo que se tradujo en el adecuado crecimiento de los explantes en condiciones *in vitro*.

4.2.2. Contenido de Carbohidratos totales, Azúcares reductores y proteínas

4.2.2.1. Proteínas solubles:

Según se observa en la figura 25, con la evaluación del contenido de proteínas solubles en las dos accesiones y variedad Sac ki para la fase de enraizamiento, se obtuvo que la variedad Sac ki y accesión C-97 con los valores más altos no presentaron diferencia significativa entre ellas pero sí se diferenciaron de la accesión Subinerme que tuvo el valor más bajo de producción de proteínas solubles.

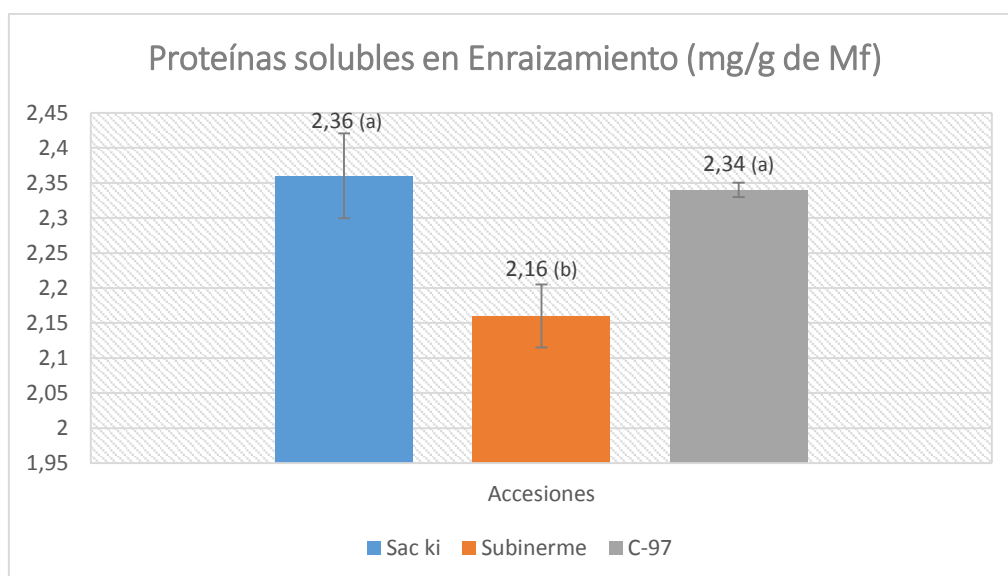


Figura 25. Contenido de proteínas solubles en fase de enraizamiento en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Los metabolitos primarios están ampliamente distribuidos en la naturaleza, manifestándose de una forma u otra en todos los organismos. Son de vital importancia y esencialmente requeridos para el crecimiento y desarrollo de las plantas por ejemplo; azúcares, proteínas, lípidos y almidón. En las plantas, tales compuestos son a menudo concentrados en semillas y órganos

vegetativos de reserva y son necesitados para el desarrollo fisiológico por su papel en el metabolismo de las células básicas. (Vijayvergia *et al.*, 2009)

Como se ha venido resaltando las proteínas representan unos de los metabolitos primarios de mayor importancia y sobretodo en condición *in vitro* donde se necesitan para promover el adecuado crecimiento y desarrollo de las vitroplantas. Como se puede observar el comportamiento del contenido de proteínas es el mismo que se obtuvo en la fase de multiplicación con diferencia de una mayor disminución en la accesión que mejor crecimiento presentó bajo estas condiciones (Subinerme). Aquí se reafirma la estabilidad adquirida en el metabolismo de las vitroplantas de las tres variantes con un mejor uso por parte de las accesiones ya que estas presentaron un mayor crecimiento así como una mayor producción de brotes. Ayala y Alcaraz (2010) también obtuvieron diferencias significativas en el contenido de proteínas entre *Paulownia imperialis* y *P. fortunei* en la evaluación del estrés salino en condiciones *in vitro* destacándose la primera como la de mayor contenido así como también la de mayor resistencia al estrés.

Además, los resultados obtenidos apuntan a que no existen cambios en la síntesis de proteínas necesarias para el crecimiento debido a que tales cambios afectarían a varias enzimas implicadas en la fotosíntesis (RUBISCO) y a la síntesis de celulosa y lignina (PAL, glucano sintetasa) (López, 1996). La ausencia de estos dos procesos de vital importancia para las plantas significaría la falta de síntesis de importantes metabolitos lo que resultaría en un gran desbalance en el metabolismo y en casos extremos a la muerte de las mismas. Esto coincide con los resultados ya que no hubo afectación a la fotosíntesis con la síntesis balanceada de pigmentos (Fig. 24) además del adecuado funcionamiento de los mismos y la ausencia de algún signo de clorosis en las hojas de las vitroplantas.

4.2.2.2. Carbohidratos totales:

En la figura 26 se observa que las accesiones Subinerme y C-97 no presentaron diferencia significativa entre ellas mientras que si se diferenciaron

de la variedad Sac ki que alcanzó el valor más bajo en contenido de carbohidratos.

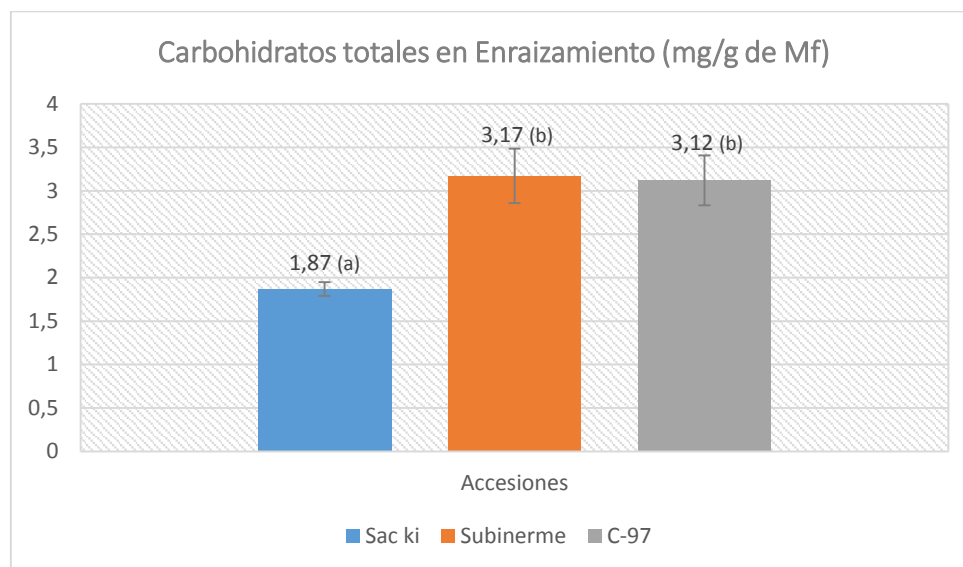


Figura 26. Contenido de carbohidratos totales en fase de enraizamiento en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Las plantas a partir de la fotosíntesis obtienen los llamados fotosintatos que una vez obtenidos en las hojas se utilizan en la producción de energía y en la formación de estructuras en las plantas (Borroto *et al.*, 2003). Así Seth y Sarin (2012) definen a los carbohidratos como importantes grupos de compuestos del carbono que son esenciales para mantener la vida. Los carbohidratos además de cumplir una importante función estructural son considerados como una fuente ideal de energía ya que pueden ser fácilmente convertidos a glucosa (Bariya y Pandya, 2014).

El contenido de carbohidratos obtenido resalta la capacidad de crecimiento observada durante el experimento por parte de las accesiones ya que estas presentaron un mayor crecimiento y ahijamiento que la variedad Sac ki el cual tampoco tuvo un mal desempeño. Ya en diversos estudios se han obtenido diferentes resultados dentro del mismo género y esto se ha atribuido a múltiples razones. La primera razón a esta diferencia son las condiciones ambientales y nutricionales a las que son expuestos las variantes, los cuales han presentado una respuesta diferencial entre las accesiones y la variedad Sac ki y esto se ha observado en cada una de las fases. Ello relacionado con la capacidad de crecimiento observada, corrobora y reafirma la mayor facultad de

adaptación, síntesis y uso de los carbohidratos para el crecimiento que tienen las accesiones Subinerme y C-97 en condiciones *in vitro*.

Si se plantea la actividad fotosintética en esta fase mediante la evaluación del contenido de pigmentos fotosintéticos (Fig. 24), se observa que de forma general existió un comportamiento similar entre las variantes en cuanto al funcionamiento del sistema en conjunto (pigmento principal y accesorios). Esto lleva a suponer que el contenido de fotoasimilatos deberían ser iguales o con valores cercanos. Según nuestros resultados existió una menor cantidad de carbohidratos en Sac ki que en las accesiones. Esta reducción pudiera ser producto de su mayor uso por parte de la variedad para su crecimiento, aunque este no fue mayor al de las accesiones que presentaron tanto un mayor contenido de carbohidratos como un mayor crecimiento. Así todo, parece apuntar hacia otro factor que determinaría la producción de cada una de estas variantes.

El factor que pudo ser dominante en el contenido de carbohidratos es el componente genético. Bariya y Pandya (2011) señalan que los porcentajes propios de diferentes constituyentes varían considerablemente de acuerdo al adorno genético y fase de crecimiento. Esto pudiera ser una de las razones de esta variación en esta investigación ya que el comportamiento fue similar en todas las fases destacándose las accesiones por encima de la variedad Sac ki. Cuenca y Vieitez (2000) también reflejaron que fue revelado que la habilidad por metabolizar diferentes tipos de carbohidratos difiere dentro del reino de las plantas y las respuestas en cultivo de brotes en diferentes tratamientos de carbohidratos resultan tener una dependencia genotípica. Todo lo antes mencionado apunta a las accesiones Subinerme y C-97 como candidatos válidos para la propagación *in vitro*.

4.2.2.3. Azúcares reductores:

El análisis estadístico del contenido de azúcares reductores no presentó diferencia significativa entre las accesiones evaluadas y la variedad Sac ki (Fig. 27).

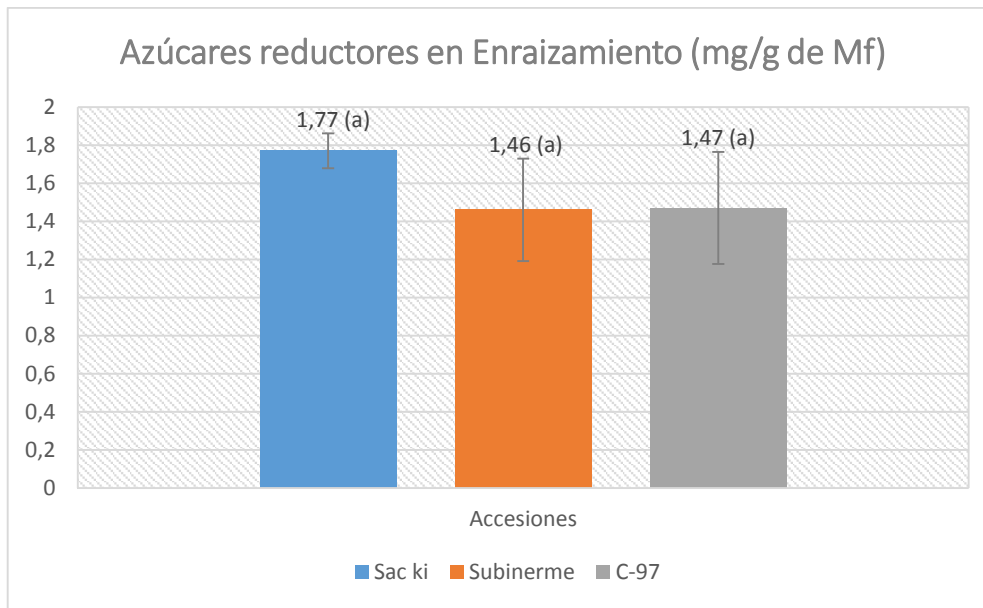


Figura 27. Contenido de azúcares reductores en fase de enraizamiento en la variedad Sac ki y sus accesiones (Clon 97 y Clon Subinerme). Medias con letras distintas difieren estadísticamente ($P < 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

A lo largo del proceso *in vitro* se nota un paulatino incremento del contenido de azúcares reductores hasta su estabilización entre todas las variantes en la actual fase donde están mejor constituidos y adaptados los órganos tanto de síntesis como de reserva. Estos hechos se reflejan en los resultados obtenidos y son apoyados por lo planteado por Larqué *et al.* (2004) según el cual en el henequén con el incremento de la superficie fotosintética, se eleva la producción de azúcares que se utilizan para el crecimiento y en última instancia, se almacenan en el tallo. Estos permiten arribar a la conclusión de que entre las tres variantes, se ha llegado por lo menos en esta fase a un punto de equilibrio en cuanto al metabolismo de la planta relacionado con la síntesis y uso de azúcares reductores. Esto sugiere además que el sistema fotosintético de las vitroplantas ha llegado a una eficiencia que posibilita la síntesis de azúcares junto con su uso para el crecimiento y su posterior acumulación. No obstante, existe una cierta contradicción en cuanto a la relación entre el contenido de carbohidratos totales (Fig. 26) y el de azúcares reductores donde los bajos valores de carbohidratos totales crean controversia con los elevados contenidos de azúcares reductores en la variedad Sac ki.

En adición a su papel esencial como sustratos en el metabolismo del carbono, energía y en la biosíntesis de polímeros, los azúcares poseen importantes funciones hormonales tales como mensajeros primarios en la señal de

transducción (Rolland *et al.*, 2002). Por otra parte, en las plantas, la producción de azúcares mediante la fotosíntesis es un proceso vital y el estatus de estos modula y coordina reguladores internos y señales ambientales que manejan el crecimiento y desarrollo. Aunque el efecto regulador de los azúcares sobre la actividad fotosintética y el metabolismo de las plantas ha sido reconocido hace mucho tiempo, el concepto de azúcares como moléculas centrales de señalamiento es relativamente novedoso. Recientes progresos han empezado a revelar los mecanismos moleculares subyacentes a vías de señalamiento de azúcares en las plantas, incluyendo la demostración de la Hexokinasa como un sensor que modula la expresión genética (Smeekens, 2000).

Experimentos bioquímicos, moleculares y genéticos han apoyado el papel central de los azúcares en el control del metabolismo, crecimiento y desarrollo de las plantas y han revelado interacciones que integran la luz, el estrés y el señalamiento hormonal (Finkelstein y Gibson, 2002) además de la coordinación del metabolismo del carbono y del nitrógeno (Coruzzi y Zhou, 2001). Esto pone de manifiesto el amplio rango de acción y efectos que pudieran tener los azúcares sobre el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas.

La fotosíntesis es activa primeramente en las células del mesófilo de hojas maduras y los fotosintatos son transportados ante todo, como sacarosa a los meristemas y órganos en desarrollo tales como hojas jóvenes, raíces, flores, frutos y semillas. La luz y los azúcares regulan estas actividades de crecimiento mediante una modulación coordinada de expresión de genes y actividad de enzimas en tejidos tanto de exportación de carbohidratos (fuente) como de importación (sumidero) (Rolland *et al.*, 2002). Esto asegura la óptima síntesis y uso de carbono y recursos energéticos y posibilita la adaptación del metabolismo del carbono a los cambios de condiciones ambientales y la disponibilidad de otros nutrientes (Coruzzi y Bush, 2001). En general, el bajo contenido de azúcares incrementa la fotosíntesis así como la movilización de reservas, mientras que la abundante presencia de azúcares promueve el crecimiento y el almacenamiento de carbohidratos.

Cheng *et al.* (2009) concluyeron en su estudio que la acumulación de productos finales de la fotosíntesis en hojas disminuyó la eficiencia fotosintética y el

intercambio de gases en hojas de melocotón (*Prunus pérsica* L.). Sin embargo, el elevado contenido de productos finales no tuvo una directa retroalimentación sobre la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo del carbono en condiciones *in vitro*. Así, cambios en la eficiencia fotosintética como respuesta a la acumulación de azúcares puede resultar en un efecto negativo sobre la eficiencia fotosintética. También señalan la posibilidad de que la acumulación de azúcares pudiera regular la fotosíntesis en hojas mediante la desactivación de algunas hormonas claves en la fijación del carbono, como la RUBISCO.

Lo antes mencionado confirma los resultados obtenidos debido a que el contenido de azúcares obtenidos en esta fase se corrobora con los niveles de crecimiento alcanzados por las variantes atribuyéndose estos resultados al papel que tienen los azúcares reductores en la regulación y modulación de la expresión de genes y la actividad de importantes enzimas, en la óptima síntesis y uso de recursos energéticos y de la regulación del metabolismo, crecimiento y desarrollo de las plantas. Sin embargo la afectación de la actividad fotosintética por acumulación de azúcares en la relación Fuente-Sumidero queda una contradicción ya que la actividad fotosintética en esta fase (Fig. 24) tuvo un buen desempeño que se tradujo en la producción de los azúcares usados por las plantas para su crecimiento. Ello significaría que no hubo una acumulación tal como para afectar el sistema fotosintético de las accesiones y variedad.

4.3-Valoración económica

La valoración económica de los resultados obtenidos en la propagación de dos nuevas accesiones de henequén y la variedad Sac ki se determinaron en CUP diferentes indicadores económicos como el costo unitario de la vitroplanta (tabla 4), los ingresos, el costo por peso, las ganancias y la rentabilidad.

Tabla 4. Cálculo de costo unitario para la micropropagación de accesiones y variedad

	Monto CUP	Monto CUC
Medio de establecimiento (40 L)	-	22,75
Medio de multiplicación (112 L)	-	640,69
Medio de enraizamiento (112 L)	-	845,87
Frascos para cultivo (6000)	-	1200,00
Hipoclorito (20 L)	66,60	-
Detergente (36 cajas)	-	50,76
Gas Licuado (6 balones)	66,00	2,58
Miscelanea	-	100,00
Autoclave (959 horas)	1342,60	234,95
Flujo Laminar (2080 horas)	524,16	91,73
Estufa (520 horas)	218,40	38,22
Destilador de agua (900 horas)	1260,00	220,50
1 Refrigerador (8640 horas)	414,00	72,58
1 Aire acondicionado 1 Tn (2080)	499,20	87,36
2 Aire acondicionado 2 Tn (2080)	7000,40	1149,12
Mano de Obra (3 Técnicos)	10 000,32	-
Depreciación de equipos	519,60	-
Depreciación de edificio (6%)	1591,65	-
Aclimatización (200000 plantas)	1800,00	480,00
Gastos Totales	25303,53	5237,12
10% Gastos Indirectos	2530,35	523,71
Costo unitario de la vitroplanta	0,159	0,01

Según los cálculos realizados se deben producir después de cuatro sub-cultivos 15006 plantas de Sac ki, 25600 plantas de C-97 y 62500 plantas de la accesión Subinerme.

Si según la tabla 4 el costo por unidad producida de planta es igual a 0,16 CUP entonces el precio de venta de cada plántula se fijaría a 0, 2 CUP aplicándole un 20% de los costos.

Tabla 5. Indicadores económicos y de multiplicación para las accesiones Subierme, C-97 y la variedad Sac ki

Indicadores	Sac ki	C-97	Subinerme
Índice de multiplicación	3,5	4,0	5,0
Ingresos (CUP)	3001,20	5120	12500
Costo total (CUP)	2400,96	4096	10000
Costo por peso	0,8		
Ganancias (CUP)	600,24	1024	2500
Rentabilidad (%)	25		

En la tabla 5 se observa que las ganancias son más altas en las accesiones C-97 y Subinerme respectivamente aunque la rentabilidad obtenida es igual en todas las accesiones incluyendo la variedad Sac ki. Esto demuestra que la rentabilidad económica no se afecta por el empleo de la propagación *in vitro* y sugiere que esta es una vía alternativa eficiente para la rápida introducción de este material vegetal en la producción.

4.4-Análisis Ambiental

La biodiversidad es uno de los pilares esenciales para la sostenibilidad de todos los sistemas agrícolas y la industria henequenera no es una excepción a esta regla. La diversidad de especies dentro de cada sistema de producción agrícola trae consigo numerosos beneficios los cuales permiten reducir la incidencia de plagas y enfermedades así como la diversificación de la producción entre otros.

La industria henequenera en la isla de Cuba se encuentra en una situación crítica ya que está constantemente amenazada por el gran espectro de

consecuencias que conlleva la falta de biodiversidad en cuanto a las variedades empleadas en la misma. Así mismo el hecho de que en Cuba se emplee solamente la variedad Sac ki mantiene altos los riesgos de incidencia de plagas y enfermedades. Esto se puede traducir en grandes pérdidas en el rendimiento y por ende en el aspecto económico que en muchos casos representa la razón de ser de la industria henequenera.

El estudio realizado en el CEBIO contribuirá a la reducción del problema antes mencionado mediante la introducción de nuevas accesiones a partir de su propagación *in vitro*. Estas accesiones por poseer mejores características productivas que la variedad Sac ki permitirán la obtención de materiales de mejor calidad, con mayores rendimientos y posibilitarán un trabajo más humanizado por la ausencia de espinas en el clon Subinerme además de reducir el riesgo de ataques por plagas y enfermedades así como las pérdidas económicas relacionadas con tales causas.

V. Conclusiones

- Se logró el establecimiento *in vitro* de las accesiones Subimerme y Clon 97 con buenos resultados en comparación con la variedad Sac ki.
- Las accesiones presentaron una respuesta positiva al inducirse la formación de brotes junto con la variedad Sac ki a las 4 semanas de encontrarse en la fase de multiplicación, destacándose la accesión Subinerme por presentar una mayor proliferación y mejor estado fisiológico.
- El enraizamiento de la variedad Sac ki y las accesiones ocurrió de forma similar, señalando estas últimas con una mejor respuesta fisiológica tras la aparición de sus raíces.
- Se logró una exitosa propagación *in vitro* de las accesiones Subinerme y C-97 las cuales mostraron una mejor respuesta fisiológica en comparación con la variedad Sac ki, donde Subinerme resultó ser indudablemente la de mejor respuesta.

VI. Recomendaciones

- Proceder a la micropropagación masiva de estas accesiones para su uso en la industria propiciando una mayor biodiversidad en la producción henequenera.
- Continuar el estudio de estas accesiones en la etapa de aclimatización para posibilitar su introducción así como la reafirmación del comportamiento de las mismas en condiciones de campo.
- Llevar a cabo un estudio biomolecular para una mejor descripción genética de las accesiones Subinerme y Clon 97.

VII. Referencias Bibliográficas

1. Abreu, E.; González, G.; Rodríguez, P.; Domech, R. y Garriga, M. 2007. Evaluación de vitroplantas de henequén (*Agave fourcroydes*) durante fase de aclimatización. ITEA-Producción Vegetal. 103 (2): 65-75.
2. Alvarado, Y. 1998. Contaminación microbiana en el cultivo *in vitro* de plantas. En: Pérez Ponce, J.N. (Ed), Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara. Cap 5. p. 81-104.
3. Anaya, D. J. M.; Ochoa, M. A.; Martínez H. D. y Moreno S. S. F. 2010. ORGANOGÉNESIS INDIRECTA DE *AGAVE PARVIFLORA*, UNA ESPECIE EN PELIGRO Y CON ALTO POTENCIAL ECONÓMICO. VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. 17al 19 Marzo de 2010 Versión digital: ISSN 1908-4197.
4. Argente, L.; López, D.R.; González, L.M.; Fonseca, I. y Ortega, E. 2010. CONTENIDO DE PROLINA, GLICINA BETAÍNA Y PROTEÍNAS SOLUBLES TOTALES EN 12 VARIEDADES CUBANAS DE TRIGO EN CONDICIONES SALINAS. Cultivos tropicales. Vol. 31 no. 4. p. 82-86.
5. Arizaga, S. y E. Ezcurra. 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Ecologia*. 101:329-334.
6. Arizaga, S. y Ezcurra, E. 2002. Propagation Mechanisms in *Agave Macroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land Succulent rosette. *American Journal of Botany* 89(4):632-641.
7. Arizaga, S.; Ezcurra, E.; Peters, E.; Ramirez de Arellano, F. y Vega, E. 2000. Pollinator ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican tropical desert. I. Floral Biology and Pollination Mechanisms. *American Journal of Botany*. 87(7): 1004-1010.
8. Ávila, A.L.; Pereyra, S. y Arguella J. 1998. Nitrogen concentration and proportion of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ affect potato cultivar response in solid and liquid media. *HortScience*. 33(2): 336-338.
9. Ayala, G. I. y Alcaraz, L. 2010. Salinity effects on protein content, lipid peroxidation, pigments, and proline in *Paulownia imperialis* (Siebold & Zuccarini) and *Paulownia fortune* (Seemann & Hemsley) grown *in vitro*.

- Electronic Journal of Biotechnology [en línea]. Disponible en: <http://10.2225/vol13-issue5-fulltext-13> [Consulta: enero, 15 2014].
10. Baraza, R. E.; Ángeles, C. S.; García, P. A. y Valiente, B. A. 2008. Nuevos recursos naturales como complemento de la dieta de caprinos durante la época seca, en el valle de Tehuacán, México. *Interciencia*. vol. 32 no. 12.
 11. Bariya, R. R. y Pandya, A. H. 2014. CORN MINT ROOTS-POSPEOUS RESOURCE OF METABOLITES, A COMPARATIVE STUDY OF *IN VITRO* AND *IN VIVO* PRODUCED PLANTS. *CIBTech Journal of Biotechnology* [en línea]. Disponible en: <http://www.cibtech.org/cjb.htm> [Consulta: febrero, 23 2013].
 12. Bariya, R. R. y Pandya, H. A. 2011. Medicinal and Aromatic properties from scented plant corn mint. (*Mentha arvensis* L.) Thesis Master of Philosophy, Department of Botany, Gujarat University, Ahmedabad, Gujarat.
 13. Bariya, R. R. y Pandya, H. A. 2014. Evaluation and establishment of promising large-scale *In vitro* production of corn mint. *International Journal of Recent Scientific Research*. 5(2): 509-512.
 14. Barry, P.; Young, A.J. y Britton, G. 1990. Photodestruction of pigments in higher plants by herbicide action. 1. The effect of DCMU (Diuron) on isolated chloroplasts. *Journal of Experimental Botany*. 41: 123-129.
 15. Bartels, D. y Sunkar, R. 2005. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 24(1): 23-58.
 16. Beniwal, R. S. y Hooda, M. S. 2011. Amelioration of planting stress by soil amendment with hidrogel mycorrhiza mixture for early establishment of beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings. *Annals of Forest Science*. 68: 803-810.
 17. Bernard, F.; Baghai M.; Hadad, S. K. 2012. *In vitro* carbohydrate stress: salicylic acid increases soluble invertase activity in *Pistacia vera* L. *in vitro* plantlets [en línea]. Disponible en: http://www.iau-saveh.ac.ir/Files/Journal/2012-05-30_06.48.07_1%20.pdf [Consulta: abril, 15 2013].
 18. Blanco, M.; Valverde, R. y Gómez, L. 2004. Micropropagación de *Dracaena deremensis*. *Agronomía Costarricense*. 28(1): 07-15.

19. Boletín ASERCA Regional Peninsular 2011. "El Henequén: Fibra de Sisal". Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria. Gobierno Federal de los Estados Unidos de México [en línea]. Disponible en: http://www.aserca.gob.mx/artman/uploads/BOLETIN_NOVIEMBRE_DICIEMBRE_2011.pdf [Consulta: marzo, 7 2013].
20. Borroto J.; Blanco M.; Tambara Y.; Capdesuñer Y.; Golle, J.L.; Balbé A.; Rivas M.; León A.; Hormaza J. y Peralta, H. 2003. Contenido de carbohidratos asociados al crecimiento y desarrollo de cuatro variedades de caña de azúcar (*Saccharum sp.*). Agronomía costarricense. 27 (1): 91-100.
21. Bouazizi, H.; Jouili, H. y Ferjani, E. E. 2007. Effects of copper excess on growth, H₂O₂ production and peroxidase activities in maize seedlings (*Zea mays* L.) Pakistan Journal of Biological Sciences. 10(5): 751-756.
22. BuenasTareas.com 2011. Henequén En Yucatán [en línea]. Disponible en: <http://www.buenastareas.com/ensayos/Henequen-En-Yucatan/1811362.html> [Consulta: mayo, 24 2013].
23. Cambrón, V. H.; España, M. L.; Sánchez, N. M.; Sáenz, R. C.; Vargas, J. J. y Herrerías, Y. 2011. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. 17(2): 253-260.
24. Carrión, M. 1988. El Henequén como planta productora de fibras duras. Boletín 15. p.7-29.
25. Carvalho, L.; Osório, L.; Chaves M. y Amâncio, S. 2001. Chlorophyll fluorescence as an indicator of photosynthetic functioning of *in vitro* grapevine and chestnut plantlets under *ex vitro* acclimatization.
26. Castro, R. D. y González, O. J. 2002. Eucalyptus (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) micropropagation in a temporary immersion system. AGRICULTURA TÉCNICA. 62 (1):68 – 78.
27. Chaves, M. M. 1994. Environmental constrains to photosynthesis in *ex vitro* plants. In: Lumsden PJ, Nicholas JR & Davies WJ (eds) Physiology, Growth and Development of Plants in Culture: 1–18.
28. Cheng, J.; Fan, P.; Li, W. y Li, S. 2009. Accumulation of End Products in Source Leaves Affects Photosynthetic Rate in Peach via Alteration of Stomatal Conductance and Photosynthetic Efficiency. Journal of the American Society for Horticultural Science. vol. 134 no. 6: 667-676.

29. Colunga, P. S. 1996. Origen, variación y tendencias evolutivas del Henequén (*Agave fourcroydes* Lem). Capítulo 1. Tesis en opción grado Científico de Doctora en Ecología. Universidad Nacional Autónoma de Mexico. 9 p.
30. Colunga, P. S. 1998. Origen, variación y tendencias evolutivas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Bol. Soc. Bot. 62:1-15.
31. Colunga, P.S. y May- Pat, F. 1997. Morphological variation of Henequen (*Agave fourcroydes*, Agavaceae) germoplasm and its wild ancestor (*A. angustifolia*) under uniform growth conditions: diversity and domestication. American Journal of Botany 84 (11): p.1449-1465.
32. Coruzzi, G. M. y Zhou, L. 2001. Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: Emerging 'matrix effects.' *Curr. Opin. Plant Biol.* 4: 247–253.
33. Coruzzi, G. y Bush, D. R. 2001. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiol.* 125: 61–64.
34. Costa, C.; Dwyer, L. M.; Dutilleul, P.; Stewart, D. W.; MA, B. L. y Smith, D. L. 2001. Inter-relationships of applied nitrogen, spad, and yield of leafy and non-leafy maize genotypes. *Journal of Plant Nutrition.* vol. 24. (8): 1173-1194.
35. Cuenca, B. y Vieitez, A. 2000. Influence of carbon source on shoot multiplication and adventitious bud regeneration in *in vitro* beech cultures. *Plant growth regulation.* 32 (1):1-12.
36. Da Silva, J. M.; Rodrigues, M.; Mauro, C. E.; Vilela S. K. y Pascal, M. 2013 [en línea]. Disponible en: <http://10.4025/actasciagron.v35i1.15356> [Consulta: marzo 2013].
37. Dixon, R. A. 1994. Plant cell culture. A practical approach. New York: IRL Press Oxford Univ. 230 p.
38. Dodds J. H. y Roberts R. W. 1985. Experiments in plant tissue culture. Ed. Cambridge University Press.
39. Domínguez, M.; Gonzáles, M.; Rosales, C.; Quiñones, C.; Delgadillo, S.; Mireles, S. y Pérez, E. 2008. El cultivo in vitro como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género agave. *Investigación y ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes* 41: 53-62.

40. Domínguez, R. M.; Alpuche, J. L.; Vasco, N. y Pérez, E. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 31: 317-322
41. Dubey, R. S. y Rani, M. 1990. Influence of NaCl salinity on the behaviour of protease, aminopeptidase and carboxypeptidase in rice seedlings in relation to salt tolerance. *Aust J Plant Physiol*. 17: 215-221.
42. Eastmond, A.; Herrera, J. L.; y Robert, M. L. 2000. La biotecnología aplicada al Henequén: Alternativas para el futuro. Centro de Investigaciones Científica de Yucatán. México. 106 p.
43. Elicriso. 2013. ¿Cómo cultivar y curar las plantas? Agave. Información de la planta. Propiedades y cultivo [en línea]. Disponible en: http://www.elicriso.it/es/como_cultivar/agave/ . [Consulta: marzo, 6 2013].
44. Figueroa O. H. C. 2011. Establecimiento de un protocolo para la propagación de Cabuya azul (*Agave americana* L.) y Cabuya blanca (*Furcraea andina* Trel.). Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de ciencias de la Vida. Sangolquí, Provincia de Pichincha, Ecuador.
45. Financiera Rural. 2011. Monografía del Henequén y Sisal. México. Dirección General Adjunta de Planeación y Análisis Sectorial. Dirección Ejecutiva de Análisis sectorial. 8 p. (monografía) [en línea]. Disponible en: [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaDaHenequ%C3%A9nSisal\(ago11\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaDaHenequ%C3%A9nSisal(ago11).pdf) [Consulta: marzo, 7 2013].
46. Finkelstein, R. R. y Gibson, S. I. 2002. ABA and sugar interactions regulating development: Cross-talk or voices in a crowd? *Curr. Opin. Plant Biol*. 5: 26–32.
47. Galzy, R. y Compan, D. 1992. Remarks on mixotrophic and autotrophic carbon nutrition of *Vitis* plantlets cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 31: 239–244.
48. García, F. J.; Roselló, C.J. y Santamarina, M.P. 2006. Introducción al funcionamiento de las plantas. Editorial: Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. 181 p.
49. Garcia, L. y Noa, J.C. 1998. Obtención de plantas libres de patógeno. En: Propagación y mejora de plantas por Biotecnología de las Plantas.

- Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. Capítulo 8. p. 135-149.
50. García, R. R. y Ortega, M. C. 2006. Manual de prácticas de fotosíntesis. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias. 1ª edición. p. 15-18.
51. García, R.; Somonte, D.; Zaldúa, Z.; Mena, J.; López, A. y Morán, R. 2008. Efficient regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of recalcitrant sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars. Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 16(2):25-33.
52. García-Mendoza, A. y Galván, R. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 56: 7-24.
53. Garriga, M.; González, G.; Alemán S.; Abreu, E.; Quiroz K.; Caligari, P. y García, R. 2010. Manejo de la Interacción Auxina-Citoquinina para Mejorar el Protocolo Micropropagación de Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) Chilean Journal of Agricultural Research, 70 (4): 545-551.
54. Garriga, M.; González, G. y Alemán, S. 2006. Comportamiento *in vitro* de la formación de brotes axilares en *Agave fourcroydes* Lem. Biotecnología Vegetal 6 (1): 3-7.
55. Gentry, H. S. 1982. Agaves of continental North America. University of Arizona Press, Tucson, AZ.
56. González G. O.; García S. A.; Barredo F. y Robert, M., L. 2002. Embriogénesis somática en *Agave fourcroydes* Lem. Centro de Estudios Biotecnológicos. Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos “. Autopista a Varadero Km. 3½. Matanzas. Cuba. Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. (CICY). Mérida. México.
57. González, G.; Alemán S. e Infante, D. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: Selection among individuals in clonally propagated population. Plant Science. (165): p.595-601.
58. González, G.; Alemán S.; Barredo, F.; Keb, M.; Ortiz, R.; Abreu, E. y Robert., M.L. 2004. Una alternativa de la recuperación henequenera de Cuba, mediante el uso de técnicas biotecnológicas y moleculares. Biotecnología Aplicada. 21(1): 44-49.

59. González, O. V.; Cruz-Sosa J.; Chavez-Avilla V. M. y Carter E. J. 2007. Conal propagation of mesquite tree (*Prosopis laevigata* Humb. And Bonpl. Ex willd. M.C. Johnston). I. via cotyledonary nodes. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 43:260-266.
60. Good-Avila, S. V.; Souza, V.; Gaut, B. S. y Eguiarte, L. E. 2006. Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). *PNAS.* 103(24): 9124-9129.
61. Groenewald E.G.; Wessels, D.C.J. y Koeleman A. 1977. Callus Formation and Subsequent Plant Regeneration from seed Tissue of an Agave species (Agavaceae). *Z. Pflanzphysiol.* vol 21. 4: 369-373.
62. Grout, W. W. 1988. Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and the stresses of transplanting. *Acta Hort.* 230: 129–135.
63. Harza, S. K.; Das, S. y Das, A. K. 2002. Sisal Plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 70:235-240.
64. Havaux, M. y Niyogi, K. K. 1999. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 96: 8762-8767.
65. Herman, E. B. 2000. Recent Advances in Plant Tissue Culture VI. Regeneration and micropropagation: technics, systems and media 1997-1999. Agritech consultants, INC., Shrub OAK. NY. U.S.A.
66. Hu, C.; Zhang, L.; Hamilton, D.; Zhou, W.; Yang, T. y Zhu, D. 2007. Physiological responses induced by copper bioaccumulation in *Eichhornia crassipes* Mart. *Hydrobiologia.* 579: 211-218.
67. Hussey, G. 1986. Vegetative propagation of plants by Tissue Culture. En: Yeoman, M. M., (ed), *Plant Cell Culture Technology.* Blackwell Sci. Publ., Oxford. p. 29-66.
68. Infante, D.; Keb-Llanes, M.; González, G. y Chi-Manzanero, B. 2002. A rapid and simple method for small-sacle DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter.* 20:1-5.
69. Info Rural, Noticias Agrarias. 2013. El henequén tenía 7 variedades, de las que 4 están perdidas [en línea]. Disponible en: <http://www.inforural.com.mx/spip.php?article131098> [Consulta: abril, 13 2013].

70. Jiménez, E. 1998. Cultivo de ápices y meristemos. En: Propagación y mejora de plantas por Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara, Cuba. Capítulo 3. p 45-56.
71. Kadam, V. B.; Ahire, P. P.; Wadikar, M. S. y Sumia, F. 2011. Evaluation of carbohydrate content in three medicinal plants of *Genus Sebania* in Maharashtra [en línea]. Disponible en: <http://jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/607/363> [Consulta: diciembre, 11 2013].
72. Koch, K. E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 509–540.
73. Koike, T.; Kitao, M.; Maruyama, Y.; Mori, S. y Lei, T. T. 2001. Leaf morphology and photosynthetic adjustments among deciduous broadleaved trees within the vertical canopy profile. *Tree Physiology.* vol. 21 no. 12-13: 951-958.
74. Larqué S. A.; Magdub M. A. y Cáceres, F. M. 2004. Proceso para la fabricación de bebida alcohólica a partir del henequén (*Agave fourcroydes*). Patente de invención. 219235, otorgada por el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México.
75. Lilly, S. J. 2001. Arborists' certification study guide. International Society of Arboriculture. Champaign, IL, USA.
76. Lin, M. J. y Hsu, B. D. 2004. Photosynthetic plasticity of *Phalaenopsis* in response to different light environments. *Journal of Plant Physiology*, v. 161, n. 11, p. 1259-1268.
77. Liu, F.; Jensen, H.R. y Andersen, M. N. 2004. Drought stress effect on carbohydrate concentration in soybean leaves and pods during early reproductive development: its implication in altering pod set. *Field Crops Research.* 86: 1-13.
78. López, C. E. 1996. Vitrificación de plantas cultivadas *in vitro* [en línea]. Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros28/28vitrificacion.html> [Consulta: septiembre, 28 2013].

79. López, M. G. y Mancilla-Margalli, N. 2002. Generation of maillanal compounds from inulin during thermal processing of *agave tequilana* Weber var Azul. *Journal Agricultural and Food chemistry*. 50: 806-812.
80. Madrigal, L.; Pineda, E. y Rodríguez, J. 1990. Agave. En: Ammirato, P.; Evans, D.; Sharp, W. y Bajaj, Y. (Eds). *Handbook of plant cell culture*. Vol. 5. Ornamental species. New York: Mac Graw-Hill. p. 206-227.
81. Mahadevan, A. y Sridhar, R. 1986. Estimation of total soluble sugar- Methods in physiological plant pathology. 147-148.
82. Mahmood, M.; Bee, O.B.; Mahmud, T. y Subramaniam, S. 2011. The growth and biochemical responses on *in vitro* cultures of *Oncidium taka* orchid to electromagnetic field [en línea]. Disponible en: http://www.cropj.com/subramanian_5_12_2011_1577_1587.pdf [Consulta: Diciembre, 11 2013].
83. Martínez, T., Plascencia, F. e Islas, L. 2013. La relación entre los carbohidratos y la vitalidad en árboles urbanos. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente* [en línea]. Disponible en <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchscfa.2012.03.016> [Consulta: octubre, 24 2014].
84. Mata, M. A.; Torres, M. G.; Hernandez, G.; Cobos, M. A., Rodriguez, G.; Luevano, A.; Guzman, D. R. y Gámez, M. M. 2001. DEGRADACIÓN *in vitro* DE *Agave mapisaga*, *Agave salmiana* var. *salmiana* Y *Agave salmiana* var. *ferox*. *Revista Chapingo serie Zonas Áridas*. 10:123-129.
85. Meharg, A. A. 1993. The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiologia Plantarum*. 88: 191- 198.
86. Mohamed, S. I. 1986. Growth and yield of tomato and squash in soil treated with Mn. *Hort. Sci*. 29: 723-730.
87. Munns, R.; Brady, C. J. y Barlow, W. R. 1979. Solute accumulation in the apex and leave on wheat during water stress. *Aust J Plant Physiol* 6: 379-389.
88. Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiología Plantarum* [en línea]. Disponible en: <https://essm.tamu.edu/media/46257/murashigeandskoogintropapersjanick.pdf> [Consulta: septiembre, 13 2013].

89. Nehra, N. S.; Kartha, K. K.; Stushnoff, C. y Giles, K. L. 1994. Effect of *in vitro* propagation methods on field performance of two strawberry cultivars. *Euphytica* 76:107-115.
90. Nikam, T. D. 1997. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 51: 225-228.
91. Nissen, S.; Namuth, D. y Hernández, I. 2004. Introducción a los Inhibidores de la Síntesis de Aminoácidos Aromáticos. [en línea]. Disponible en: <http://plantandsoil.unl.edu/pages/printinformationmodule.php?idinformationmodule=1008088419> [Consulta: septiembre, 28 2014].
92. Otero B. R. 1999. El cultivo del henequén (*Agave fourcroydes*, Lem.) como planta textil y su aprovechamiento integral. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 3 (9): 23 - 46.
93. Pallardy, S. G. 2008. *Physiology of woody plants* (3rd edition) [en línea]. Disponible en: [http://ip144.qb.fcen.uba.ar/libros/ftp/Biologia/Hongos%20y%20Plantas/Pallardy%20%20Physiology%20of%20Woody%20Plants%203e%20\(Elsevier,%202008\).pdf](http://ip144.qb.fcen.uba.ar/libros/ftp/Biologia/Hongos%20y%20Plantas/Pallardy%20%20Physiology%20of%20Woody%20Plants%203e%20(Elsevier,%202008).pdf) [Consulta: Diciembre, 12 2013].
94. Pandey, R. M. y Singh, S. P. 1989. Field performance of *in vitro* raised plants. *Indian. J. Hortic.* 33: 1-7.
95. Parida, A. K.; Das, A. B. y Das, P. 2002. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *J. Plant Biol.* 45: 28-36.
96. Parvaiz, A. y Satyawati, S. 2008. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants - a review. *PLANT SOIL ENVIRON.* 54 (3): 89–99.
97. Peña, C.; Nic-Can, G.; Ojeda, G.; Herrera, J. L.; López, A.; Wrobel, K. y Robert, M. 2012. KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave spp.* *BMC Plant Biology*. 12: 203 [en línea]. Disponible en: doi:10.1186/1471-2229-12-203. [Consulta: Marzo, 18 2014].
98. Peña, E.; González, G.; Berrillo, A.; Sosa, D.; Arteaga, M.; Rittoles, D.; Pérez, D. y Torriente, Z. 1997. Tecnología para la micropropagación del Henequén a gran escala. *Rev. Jardín Botánico Nacional*. 18: 169-176.

99. Percival, G. C.; Barrow, I.; Noviss, K.; Keary, I. y Pennington, P. 2011. The impact of horse chestnut leaf miner (*Cameraria ohridella* Deschka and Dimic; HCLM) on vitality, growth and reproduction of *Aesculus hippocastanum* L. Urban Forestry & Urban Greening. 16: 11-17. doi:10.1016/j.ufug.2010.11.003.
100. Peres, E. P. y Kerbauy, G. B. 1999. High cytokinin accumulation following root tip excision changes the endogenous auxin-to-cytokinin ratio during root-to-shoot conversion in *Catasetum fimbriatum* Lindl (Orchidaceae). Plant Cell Reports. 18:1002-1006.
101. Perezmolphebanch, E.; Gidekel, M.; Seguranieto, M.; Herrera, L. y Ochoa, N. 1996. Effects of water stress on plant growth and root proteins in three cultivars of rice (*Oryza sativa*) with different levels of drought tolerance. Physiol. Plant. 92: 284–290.
102. Piven, N. M.; Barredo-Pool, F. A; Borges-Argáez y Robert, M.L. 2002. Key events in the regulation of somatic embryogenesis in monocots: Agaves. Bulletin of the state Nikitsky Botanical Gardens. vol. 86:12-16.
103. Piven, N.; Barredo, F.; Borges, I.; Herrera, M.; Mayo, A.; Herrera, L. y Robert, M. 2001. Reproductive biology of henequen (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave angustifolia* (Agavaceae): Gametophyte development. American Journal of Botany. 88:1966-1976.
104. Powers, D. E. y Backhaus, R.A. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 16:57-60.
105. Radio Rebelde. 2013. Matanceros apuestan por el fomento, cultivo y procesamiento del henequén [en línea]. Disponible en: <http://www.radiorebelde.cu/noticia/matanceros-apuestan-por-fomento-cultivo-procesamiento-henequen-20130528/> [Consulta: abril, 13 2013].
106. Robert, B.; Horton, P.; Pascal, A. A. y Ruban, A. V. 2004. Insights into the molecular dynamics of plant light-harvesting proteins in vivo. Trends in Plant Science. 9: 385–390.
107. Robert, M. L.; Herrera, J. L.; Chan, J. L. y Contreras, F. 1992. Micropropagation of *Agave spp.* Biotechnology in Agriculture and Forestry 19: 306-329.

108. Robert, M. L.; Herrera, J. L.; Contreras, E. y Scorer, K. N. 1987. *In Vitro Propagation of Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell and Organ Culture*. 8: 37-48.
109. Rodríguez, G. B.; Gutiérrez, M. A. y Santacruz, R. F. 1996. Métodos de propagación biotecnológicos y convencionales en agaváceas para zonas áridas. En: Izquierdo J., Palomino G. (Eds.). *Técnicas Convencionales y Biotecnológicas para la Propagación de Plantas de Zonas Áridas*. FAO Regional Office for the Latin American and Caribbean Region, Santiago, Chile: 57-86.
110. Rolland, F.; Moore, B. y Sheen, J. 2002. Sugar Sensing and Signaling in Plants [en línea]. Disponible en: <http://dx.doi.org/http://dx.doi.org/10.1105/tpc.010455> [Consulta: septiembre, 13 2013].
111. Romero, E. D. 2009. EVALUACIÓN DE REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL EN SEMILLAS Y PLÁNTULAS DE AGAVE PULQUERO (*Agave atrovirens* KARW. EX SALM-DYCK) Y SU IMPLICACIÓN EN UN SISTEMA DE PROPAGACIÓN. Tesis en opción al título de Máster en Tecnología Avanzada. Instituto politécnico de Tlaxcala. México [en línea]. Disponible en: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8680/Tesis-maestria-Elda-Mireya-Romero-Tepal2.pdf?sequence=1> [Consulta: diciembre, 7 2012].
112. Salazar, E.; González, P. y Hernández, C. 2009. Multiplicación *in vitro* de *Agave cocui* Trelease a través de yemas axilares [en línea]. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/at/v59n2/art02.pdf> [Consulta: noviembre, 28 2014].
113. Santacruz, R. F.; Gutiérrez, H. y Rodríguez, G. B. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 56: 163-167
114. Serrano, 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4 Manual Serrano Gregory J. Hannon & David Beach *Nature*. 366: 704 - 707.
115. Seth, R. y Sarin, R. 2012. *IN VIVO AND IN VITRO* BIOCHEMICAL ESTIMATION OF PRIMARY METABOLITES FROM *JATROPHA CURCAS*: AN IMPORTANT BIODIESEL PLANT [en línea]. Disponible en:

<http://www.ijppsjournal.com/Vol4Suppl1/3004.pdf> [Consulta: febrero, 18 2013]

116. Shafiqur, R. K.; Robin, R. D. y Thomas, E. S. 2000. Effects of shade on morphology, chlorophyll concentration and chlorophyll fluorescence of four Pacific Northwest conifer species. *New Forests* 19: 171-186. DOI: 10.1023/A:1006645632023.

117. Silva-Montellano, A. y Eguiarte, L. E. 2003. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. I. Floral characteristics, visitors and fecundity. *American Journal of Botany* 90 (3): 377-387.

118. **Smeekens, S.** 2000. *Sugar-induced signal transduction in plants*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 49–81.

119. Smirnov, N. 2005. *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. School of Biological and Chemical Sciences. University of Exeter. UK.

120. Styer, D.J. y Chin, C.K. 1983. Meristem and shoot tip culture for propagation, pathogen elimination, and germplasm preservation. *Horticultural Reviews*, 5:221-277.

121. Sumner, J. B. 1921. Dinitrozalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic. *J. Biol. Chem.* 47: 5-9.

122. Swartz, H. J. 1981. Field performance and phenotypic stability of tissue culture propagated strawberry. *J. American. Soc. Hort. Sci.* 106 (5): 667-673.

123. Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. *Plant physiology* (4th ed.). Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates Inc.

124. Taji, T.; Ohsumi, C.; Iuchi, S.; Seki, M.; Kasuga, M.; Kabayashi, M.; Yamaguchi, S. K. y Shinozaki, K. 2002. Important roles of drought-and cold inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 29: 417-426.

125. Talukdar A. 2012. EVALUATION OF FEW BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THE IN VITRO GROWN CALLUS TISSUE OF *Aquilaria agallocha* ROXB. *Indian J.L.Sci.* 2(1): 17-19 [en línea]. Disponible en: http://www.ijls.in/upload/614137434PAPER_3.pdf [Consulta: abril, 13 2013].

126. Tichá, I.; Cáp, F.; Pacovská, D.; Hofman, P.; Haisel, D.; Capková, V. y Schäfer, C. 1998. Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. *Physiol. Plant.* 102: 155-162.
127. Tisserat, B. 1985. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. En: R.A. Dixon (ed.), *Plant cell Culture, a Practical Research*. IRL Press, Oxford. p 79-105.
128. Townsend, A. M. y Hanover, J. W. 1972. Altitudinal variation in photosynthesis, growth, and monoterpene composition of western white pine (*Pinus monticola* Dougl.) seedlings. *Silvae Genetica*. 21(3-4): 133-139.
129. Trouverie, J.; The´venot, C.; Rocher, J.P.; Sotta, B. y Prioul, J. L. 2003. The role of abscisic acid in the response of a specific vacuolar invertase to water stress in the adult maize leaf. *J. Exp. Bot.* 54: 2177-2186.
130. Valenzuela S. K.; Juarez, H. R.; Cruz, H. A.; Olalde, P. V.; Valverde, M. y Paredes, L. O. 2006. Plant Regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogénesis. *In vitro and Development Biology Plant.* 42(4):336-340.
131. Van Huylenbroeck, J. M.; Piqueras, A. y Deberg, P. C. 2000. The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated *Calathea* plants. *Plant Sci.* 135: 59-66.
132. Vassilev, A.; Lidon, F.; Scotti, P.; Ramalho, J. C.; Barreiro, M. G. y Yordanov, I. 2003. Cu-induced changes in chloroplast lipids and photosystem 2 activity in Barley plants. *Bulg. J. Plant Physiol.* 29(1-2): 33-43.
133. Vijayvergia, R.; Sharma S. y Singh T. 2009. Biochemical estimation of primary metabolites of some medicinal plants of Euphorbiaceae family. *J. Indian. Bot. Soc.* 88(1-2): 116-119.
134. Vinent, E. y Fajardo, O. 2009. Estrategia para el mejoramiento genético de *Agaves* en Cuba. *Temas de ciencia y tecnología*. p. 37-43.
135. Wang, W.; Vinocur, B. y Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: toward genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. vol. 218 no.1: 1-14.

136. Watson, C.; Rulford, I. D. y Riddell, B. D. 2003. Screening of willow species for resistance to heavy metals: comparison of performance in a hydroponics system and field trials. *Int. J. Phytorem.* 5 (4): 361-365.
137. Watson, C.; Rulford, I. D. y Riddell-Black, D. 2003. Screening of willow species for resistance to heavy metals: Comparison of performance in a hydroponics system and field trials. *Int. J. Phytorem.* 5 (4): 361-365.
138. Wetztein, H. I. y Sommer, H. E. 1982. Leaf anatomy of tissue cultured *Liquidambar styraciflua* (Hamamelidaceae) during acclimatization. *Am. J. Bot.* 69: 1579-1586.
139. Yépez, L.; De García, E. y Vargas, E. 2001. Notas preliminares sobre la propagación clonal *in vitro* de *Agave cocui* Trel., Venezuela.
140. Zaman, A.; Islam, R. y Joarder, O. I. 1997. Field performance and biochemical evaluation of micropropagated mulberry plants. *Plant cell, Tissue and Organ Culture.* 51: 61-64.
141. Zamudio, D. M.; Pinos, J. M.; González, S. S.; Robinson, P. H.; García, J. C. y Montañez, O. 2009. Effects of *Agave salmiana* Otto Ex Salm-Dyck silage as forage on ruminal fermentation and growth in goats. *Animal Feed Science and Technology.* 148:1-11.
142. Zeid, I. M. 2004. Response of Bean (*Phaseolus vulgaris*) to Exogenous Putrescine Treatment under Salinity Stress. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 7 (2): 219-225.
143. Zhang, S. B.; Hu, H. y Li, Z. R. 2008. Variation of photosynthetic capacity with leaf age in an alpine orchid, *Cypripedium flavum*. *Acta Physiologiae Plantarum.* vol. 30 no. 3: 381-388.
144. Zhang, S. B.; Hu, H.; Xu, K. y Li, Z. R. 2006. Photosynthetic performances of five *Cypripedium* species after transplanting. *Photosynthetica.* Vol. 44 no. 3: 425-432.
145. Zhu, Y. J.; Komor E. y Moore, P. H. 1997. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiology.* 115: 609-616.