

Aclimatación de plantas de henequén micropropagadas (*Agave fourcroydes* Lem.). Estudio de diferentes condiciones en la etapa de vivero

E. Abreu^{*,**}, G. González^{**}, R. Ortiz^{***}, P. Rodríguez^{****},
R. Domech^{*****}, M. Garriga^{**}

*Facultad de Agronomía, Departamento de Agricultura, Universidad de Matanzas. Autopista a Varadero km 3 1/2, C.P 44740, Matanzas, Cuba.

**Facultad de Agronomía, Grupo de Biotecnología Vegetal, Centro de Estudios Biotecnológicos, Universidad de Matanzas. Autopista a Varadero km 3 1/2, C.P 44740, Matanzas, Cuba.

***Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Departamento de Genética y Mejoramiento de Plantas. Carretera a Tapaste km 3 1/2, San Jose de las Lajas, La Habana, Cuba.

****Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Departamento de Fisiología Vegetal. Carretera a Tapaste km 3 1/2, San Jose de las Lajas, La Habana, Cuba.

*****Facultad de Agronomía, Departamento de Ciencias Químicas y Biológicas, Universidad de Matanzas. Autopista a Varadero km 3 1/2, C.P 44740, Matanzas, Cuba.

Resumen

Con el objetivo de establecer criterios para el proceso de aclimatación de plantas de henequén y su seguimiento en la etapa de vivero, se llevaron a cabo tres experimentos independientes. Las plantas fueron micropropagadas siguiendo el protocolo establecido por González (2001). En el primer experimento se evaluó el efecto del tamaño de las plantas sobre la tasa de supervivencia durante la aclimatación. Los mejores resultados correspondieron a los calibres superiores a 6,9 cm. En el segundo experimento se evaluó el efecto de diferentes niveles de materia orgánica (MO) en el sustrato, obteniéndose los mejores resultados para la combinación con un 10% de MO. En el tercer experimento se estudiaron diferentes condiciones de la etapa de vivero, evaluándose diferentes tipos de sustrato y marco de plantación. Los resultados mostraron que el tipo de sustrato influye significativamente en el comportamiento de las plantas en esta etapa.

Palabras clave: Propagación *in vitro*, Adaptación, Sustrato Orgánico, Fibra natural.

Summary

Acclimatization of micropropagated henequen plants (*Agave fourcroydes* Lem.). Study of different nursery conditions

Three independent experiments were carried out in order to establish criteria for the process of acclimatization of henequen plants and their pursuit in the nursery stage. Plants were micropropagated following the protocol developed by González (2001). In the first experiment the size effect of plant let size on survival rate during acclimatization was evaluated. Best answers were obtained for calibers higher than 6.9 cm. In a second experiment the effect of different levels of organic matter (OM) in the substratum was evaluated in the sustrato. Best results are obtained supplementing substratum with 10% of organic matter. The third experiment analyses the effect of different substrate and plantation parameters in nursery state. The results showed that the condition of the substratum plays a significant role in acclimatization of micropropagated plants of henequen.

Key words: *In vitro* Propagation, Adaptation, Organic Substrate, Natural fiber.

Introducción

El henequén, como otros representantes del género *Agave*, es una planta pentaploide con fertilidad reducida (Piven *et al.*, 2001) y la escasa propagación mediante reproducción que pudiera tener lugar se impide por la práctica habitual de cortar la inflorescencia (Peña *et al.*, 1997), para evitar los daños que la floración causa a la calidad de la fibra.

Desde siempre el henequén se ha propagado asexualmente a través de los hijos basales o del rizoma, con posterioridad se incorporó la propagación por bulbillos producidos por la inflorescencia y en los últimos años se han desarrollado tecnologías para la propagación a escala de laboratorio, (Madrigal *et al.*, 1990; Robert *et al.*, 1992, Peña *et al.*, 1997; González, 2001 y González *et al.*, 2002) cada una de estas vías asexuales de propagación presenta ventajas y desventajas, y es precisamente su utilización racional lo que puede contribuir a que en menor tiempo se logren plantaciones de henequén homogéneas y de alta calidad en el país.

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, es una técnica que permite la propagación vegetativa aséptica de miles de plantas genéticamente similares a la planta madre, aunque en la micropropagación se han observado anomalías en la anatomía de las hojas como: un reducido desarrollo de la cutícula, cierre estomático anormal (Sallanon *et al.*, 1993; Pospisilova *et al.*, 1998), alta densidad estomática (Santamaría *et al.*, 1995) y anomalías en la estructura del parénquima en empalizada (Dami y Hughes, 1995), que provocan la incapacidad de las plantas para controlar la pérdida de agua después de ser transferidas a condiciones *ex vitro*. Esto sugiere que las condiciones *in vitro*, generan diferencias en la anatomía y fisiología de las plantas con respecto a las cultivadas en condiciones naturales (Pospisilova *et al.*, 1997), por ello necesitan para su supervivencia en

condiciones *ex vitro* una gradual aclimatación a las condiciones medioambientales del invernadero o de campo.

La aclimatación, es una de las fases críticas en la propagación *in vitro* (Van Huylbroeck y Debergh, 1996), cuando el material micropropagado se transfiere a condiciones *ex vitro*. Si esa transferencia no tiene éxito, puede resultar en una significativa pérdida del material propagado (Robert *et al.*, 1999) y afectarse en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso (Agramonte *et al.*, 1998).

En el método tradicional de propagación de henequen el paso por el vivero constituye una fase importante porque en ella se logran plantas sanas con buen desarrollo y se asegura una mejor selección del material y, en consecuencia una mayor uniformidad de las plantaciones, las plántulas que son recogidas en el campo para ser establecida en el vivero no deben ser inferiores a los 15 cm y deben ser agrupadas según su tamaño. Es difícil lograr que plantas provenientes de la micropropagación alcancen este porte durante el corto período de la aclimatación, tratar de alargar esta etapa en función de cumplir el objetivo anterior teniendo en cuenta todos los recursos que se ponen en función de este proceso es un gasto innecesario.

La propuesta de una etapa intermedia entre la aclimatación y el vivero tradicional (vivero) permite preparar a la planta para soportar los rigores de las condiciones de campo de forma menos agresiva, y lograr el desarrollo adecuado que le permita en un tiempo mínimo alcanzar el patrón de calidad (15 cm) establecido por los productores para entrar en la etapa de vivero.

Este trabajo pretende evaluar algunos componentes de la fase *ex vitro* del proceso de micropropagación para el cultivo del henequén a partir de la metodología establecida por González (2001).

Materiales y métodos

Técnicas y procedimientos generales

a. Selección del material vegetal

En todos los experimentos se utilizaron plantas seleccionadas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) variedad Sac ki o henequén blanco de buena calidad, procedentes del 8° subcultivo de micropropagación según el protocolo de González (2001). Las plantas fueron enraizadas durante 30 días en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 0,5 mg/L de ANA, con las sales de nitrógeno ligeramente modificadas por Robert et al. (1992).

b. Preparación del material vegetal

Las plantas seleccionadas fueron extraídas de los frascos *in vitro* y lavadas cuidadosamente con agua corriente para eliminar el agar de los brotes y raíces, podando estas últimas para una mejor acomodación de la planta en el sustrato. Las plántulas de los lotes experimentales fueron clasificadas por su tamaño y fueron sometidas a un periodo de 10 horas de imbibición en agua destilada antes del trasplante y en el momento de la siembra en la bandeja la parte basal y la zona de las raíces se sumergieron en una solución de oxícloruro de cobre de 14,5g/L (De Faz y De Cossio, 1983)

c. Condiciones del proceso de aclimatación

La aclimatación se realizó en invernadero controlando la intensidad luminosa (Agramante et al., 1998), a través de diferentes condiciones creadas con el empleo de capas de malla zaran de color negro, estableciéndose una zona que permitía el paso del 30% de la luz ($\approx 558,74$ y $686,55 \mu\text{mol/s.m}^2$). En estas condiciones las plántulas fueron ubicadas durante las dos primeras semanas y otra zona con el paso de la luz del 70%

(\approx entre $1303,37$ y $1602,04 \mu\text{mol/s.m}^2$), hacia donde se trasladaron posteriormente hasta su ubicación en vivero. Para la medida del paso de la luz se utilizó un luxómetro del tipo PU 150.

Las plantas fueron trasplantadas en bandejas de poli espuma de 247 alvéolos (47×69 cm, volumen de alveolo 30 cm^3), con un sustrato orgánico obtenido a partir de la pulpa de henequén fermentado, solo o mezclado con zeolita. El material orgánico fue tamizado a un diámetro de 0,6 cm.

La humedad relativa se mantuvo por encima del 90% durante las dos primeras semanas, aplicándose entre 12 y 14 riegos diarios en forma de neblina entre las 9:00 y las 16:00 h, a intervalos de 30 minutos y durante 5 minutos, procurando la no incidencia del agua de riego directamente sobre el sustrato, a partir de la tercera semana el intervalo se amplió a un riego cada 60 minutos, disminuyéndose en un 50% el número de riegos y manteniendo el tiempo de aplicación. La humedad relativa se registró con un hidrotérmo grafo del tipo VEB.

d. Condiciones del crecimiento en vivero

Para esta fase se utilizaron canteros de hormigón, con un área de $2,5 \text{ m}^2$, rellenos con residuos orgánicos de pulpa de henequén fermentada o suelo, ubicados en condiciones naturales en áreas de la propia universidad. Durante toda la etapa se contó con la posibilidad de riego, haciéndose una aplicación diaria durante las 10 o 12 primeras semanas, manteniendo la humedad del sustrato por debajo de los niveles de saturación, posteriormente el intervalo se amplió a un riego cada dos días, también con la característica de humedecer por debajo de los niveles de saturación.

Los experimentos se realizaron siempre de abril a septiembre.

Tabla 1. Análisis químico del material orgánico de pulpa de henequén fermentada en base húmeda. (31,3% de humedad de campo)

Table 1. Chemical analysis of the organic matter of fermented henequen pulp in wet base (31.3% of field humidity)

% K	C/N	Dsp (g/cm^3)	% Ca	% Mg	% P	% MO	PH	% N
0,03	10	0,48	1,49	0,26	0,07	22,4	8	1,30

Procesada por la técnica analítica para abonos orgánicos (Paneque et al., 1999).

Experimento 1. Efecto del tamaño de las plantas micropropagadas sobre la tasa de supervivencia en la fase de aclimatación.

Con el objetivo de evaluar el efecto del tamaño de las plantas en la supervivencia de las mismas, se crearon cuatro grupos o categorías de acuerdo con su altura y porte, en correspondencia con criterios establecidos por Agramonte et al., (1998), Ortíz (2000) y Yanes et al., (2000). A cada una de estas categorías en estudio se le midió además el número de hojas (N° de hojas) y la masa fresca total (Mf.T). El experimento se estableció con un diseño aleatorio, utilizándose para cada tratamiento las plantas provenientes de 25 frascos (125 plantas). Se tomaron datos de supervivencia comparándose las siguientes variables: I (< 5 cm), II (entre 5 y 6,9 cm), III (de 7 a 9 cm) y IV (> 9 cm).

Experimento 2. Establecimiento de un sustrato adecuado para la aclimatación.

Se utilizaron plántulas micropropagadas de entre 7 y 9 cm. Se elaboraron mezclas de residuo orgánico de pulpa de henequén fermentada con zeolita, siguiendo los patrones de calidad para sustratos orgánicos de Paneque (1998). Los tratamientos de estudio se establecieron a partir de cuatro niveles diferentes de materia orgánica en la mezcla (tabla 2), calculados por la metodología de Paneque (1998), con diferentes condiciones de densidad en el sustrato ($0,59 - 0,71 \text{ g/cm}^3$), para cada tratamiento se elaboró un volumen de mezcla equivalente a 10 kg. Se utilizaron 40 plantas por tratamiento. Se tomaron datos de supervivencia de las 40 plantas a los 30 días y el área foliar (Af) y el peso seco total (Pst) se determinó a

Tabla 2. Variantes de estudio para el establecimiento de los sustratos
Table 2. Study variants for the establishment of substrates

Tratamientos	% MO	Densidad (g/cm^3)	Cantidad de los materiales mezclados en kg	
			** Zeolita	*** Pulpa de henequén
1	8	0,71	6,43	3,57
2	10	0,66	5,54	4,46
3	12	0,62	4,65	5,35
4	14	0,59	3,75	6,25

Mezcla equivalente a 10 kg

** Zeolita sin cargar, con una densidad de $0,98 \text{ g/cm}^3$, granulometría de 1-2 mm.

*** Pulpa de henequén con fermentación de 180 días, de la Empresa Henequenera Eladio Hernández León. Tamizada a 60 mm.



los 45 días, utilizándose para estos dos últimos indicadores un tamaño de muestra de 10 plantas por tratamiento. En el proceso estadístico de los porcentajes de supervivencia por tratamiento se aplicó el análisis de proporciones de la prueba de hipótesis y para la comparación de las medias por variante, referente a Af y Pst, se utilizó la estimación de las medias con un nivel de significación estadística de $p < 0,05$.

Experimento 3. Estudio de diferentes condiciones de la fase de vivero.

Se evaluaron diferentes tratamientos teniendo en cuenta el tipo de sustrato y el marco de plantación, siguiendo las recomendaciones técnicas para el cultivo del henequén del Cuba Minagri (Cuba MNG, 1986). Como resultados se evaluaron tres indicadores

relacionados con el vigor de las plantas: Tamaño, Número de hojas y Grosor del pseudotallo, de acuerdo con Otero (1999) y Enríquez et al., (2000). Los muestreos se hicieron en el momento del trasplante y a los 150 días. En la tabla 3 se describen los tratamientos de estudio a partir de los factores evaluados.

El diseño desarrollado fue un totalmente aleatorizado con arreglo bifactorial, con un total de 6 tratamientos y tres repeticiones por tratamiento; en cada unidad experimental se utilizó un total 35 plántulas.

En el procesamiento de los resultados se aplicó un análisis de varianza para el 95% de significación y la prueba de rangos múltiples de Duncan para la discriminación de las medias.

Tabla 3. Alternativas de estudio a partir de los factores evaluados
Tabla 3 Study alternatives according to the evaluated factors

Tipo de vivero	Sustrato	Marco de plantación (cm)	
		10 x 10	15 x 15
Cantero hormigón (I)	P. henequén fermentada	T ₁	T ₂
" " (II)	P. henequén fermentada más suelo. 1:1, v-v	T ₃	T ₄
" " (III)	Suelo sólo	T ₅	T ₆

Suelo: Ferralítico Rojo

T₁, T₂, T₃, T₄, T₅ y T₆: tratamientos independientes

P. henequén (Residuo orgánico de pulpa de henequén fermentada)

v-v: Volumen-Volumen.

Resultados y discusión

Experimento 1

En la tabla 4 se muestra el efecto del tamaño en la supervivencia de las plantas de henequén micropropagadas.

Se destaca un efecto significativo del tamaño y el peso fresco asociado a este en los índices de supervivencia de las plántulas.

Las categorías III y IV, en las que las plántulas presentan mayor tamaño (7-9 cm y > 9 cm) y peso fresco (> 0,89 g), alcanzan los niveles de supervivencia más altos en un sustrato 100% orgánico, difiriendo significativamente de las categorías I y II, en las cuales los porcentajes son inferiores al 15 y 32% respectivamente; lo que indica un efecto positivo de las reservas adquiridas por las plantas durante la micropropaga-

ción para sobrevivir al estrés durante la aclimatación, de acuerdo con Pospisilova et al. (2000) y Kozait et al. (1991) y con Ortiz et al. (1998b), Yanes et al. (2000) y Rodríguez (2005) en cuanto a la influencia del tamaño y el peso fresco en el éxito de la aclimatación de plántulas de caña de azúcar, plátano y piña, más significativo en henequén por ser una especie de crecimiento lento.

El henequén es una planta xeromórfica, con un ritmo de crecimiento lento, pudiendo llegar a emitir un adulto en condiciones favorables entre 25 y 30 hojas anuales máximo (Otero, 1999; Otero et al., 2000); se agrupa además dentro de las plantas CAM. A destacar que los desordenes fisiológicos de las plantas micropropagadas consecuencia del cultivo *in vitro* señalado por Debergh y Zimmerman (1991); Robert et al. (1992) y Pospisilová et al. (1997), junto con el lento crecimiento de esta especie, y la condición de planta CAM, hacen que las plantas de henequén sean muy vulnerables durante los primeros 15 días de la aclimatación, si no se utiliza un material adecuado con suficientes reservas nutricionales para

soportar el estrés del trasplante y el cambio a un metabolismo autotrófico. El índice de supervivencia se estabiliza en esta especie a partir de los 30 días de aclimatación.

El total de individuos de las categorías más pequeñas (< 7 cm), representan más del 50% de la población en estudio, lo que puede resultar, si no se corrige en una significativa pérdida del material a propagar. Sí, pues el tamaño de las plántulas y las condiciones de sustrato resultan pues en una menor tasa de supervivencia, inferior a lo obtenido en laboratorios comerciales: 85-90% (Rodríguez, 2005). Este mayor rendimiento se debe al uso de plántulas de mayor calidad y al control en vivero de factores como la humedad relativa, la temperatura y la luz. Hay que reseñar que las plantas de tamaños inferiores a 7 cm de talla y de menos de 0,51 g de peso fresco reducen la tasa de supervivencia, aunque el sustrato sea óptimo. Hay pues que realizar una selección de plantas de calidad en la fase de enraizamiento para obtener un rendimiento adecuado del proceso de micropropagación.

Tabla 4. Efecto del tamaño de las plantas en la supervivencia bajo condiciones de sustrato 100% orgánico (pulpa de henequén fermentada)

Table 4. Effect of plants size in the survival under substrate conditions of 100 % of organic matter (fermented pulp of henequen)

Categorías	% que Representan	Indicadores		% de Supervivencia (30 días)
		Masa fresca (g)	No de Hojas	
I (< 5 cm)	21,31	0,24 ^d ± 0,03	2,9 ^c ± 0,16	12,0 ^c ± 0,052
II (5-6,9 cm)	30,91	0,42 ^c ± 0,04	3,9 ^{bc} ± 0,20	31,8 ^b ± 0,043
III (7-9 cm)	27,40	0,89 ^b ± 0,07	4,8 ^b ± 0,20	76,92 ^a ± 0,046
IV (> 9 cm)	20,37	1,68 ^a ± 0,09	5,8 ^a ± 0,23	80,45 ^a ± 0,053

± (Error estándar)

Los tratamientos con letras diferentes difieren significativamente para $p < 0,05$. Cada dato de peso fresco y No de hojas representa la media para $n = 30$

Experimento 2

El sustrato de plantación es de gran trascendencia para el éxito de la aclimatación de las plantas micropropagadas, por lo que es importante desarrollar un sustrato para cada especie en estudio.

En la tabla 5 se muestra el efecto del sustrato en la supervivencia y desarrollo de las plantas de henequén micropropagadas como ocurre en otras especies (Agramonte et al., 1998; Paneque, 1998 y Ortiz et al., 1998a). Para todos los casos estudiados los porcentajes de supervivencias fueron superiores al 80% a los 30 días de la aclimatación, alcanzando valores máximos significativamente diferentes para la combinación de 8 y 10% de MO. Sin embargo para el área foliar y peso seco total se obtuvieron los valores más bajos para la combinación de 8%, siendo superiores y análogos para las demás combinaciones. En la figura 1 los intervalos de confianza para la media de estos indicadores sugieren que en nuestras

condiciones, incrementos superiores al 10% de MO no modifican significativamente en el crecimiento de las plántulas.

Los menores porcentajes de supervivencia en los tratamientos con mayor contenido de materia orgánica, pueden explicarse de una parte, por la combinación de una mayor presencia de hongos del suelo en el sustrato y la susceptibilidad de las plántulas procedentes de la condición *in vitro*, y por otra, por los altos niveles de humedad asociados a altas proporciones de materia orgánica, que provocarían pudrición y muerte prematura de las plántulas. Estos resultados indican que la supervivencia disminuye al utilizar sustratos ricos en materia orgánica durante la aclimatación, ya que en dichos sustratos proliferan microorganismos patógenos o saprófitos que pueden dañar las plantas (Eastmond et al., 2000 y Yanes et al., 2000).

El uso de zeolita en los sustratos tiene efectos positivos en el crecimiento de las plántulas (Ortiz et al., 1998a y Paneque, 1998).

Tabla 5. Efecto del sustrato en el comportamiento de las plantas durante la fase de aclimatación
Table 5. Effect of the substratum type in the behavior of plants during the acclimatization stage

% MO	Proporciones de los materiales mezclados en kg		DS. de la Mezcla g/ (cm ³)	Area Foliar (cm ²)	Peso seco total (mg)	% de supervivencia 30 días
	P.henequén	Zeolita				
8	3,57	6,43	0,71	5,79 ^b	45,57 ^b	93,33 ^a
10	4,46	5,54	0,66	7,64 ^a	59,43 ^a	92,5 ^a
12	5,35	4,65	0,62	7,36 ^{ab}	54,28 ^{ab}	84,16 ^b
14	6,25	3,75	0,59	6,36 ^{ab}	54,98 ^{ab}	83,33 ^b
Es x				0,52	4,38	

Los tratamientos con letras diferentes difieren significativamente. Cada dato de área foliar y peso seco total representa la media para n = 30. El porcentaje de supervivencia se comparó para p < 0.05

Es x: error estándar de la media

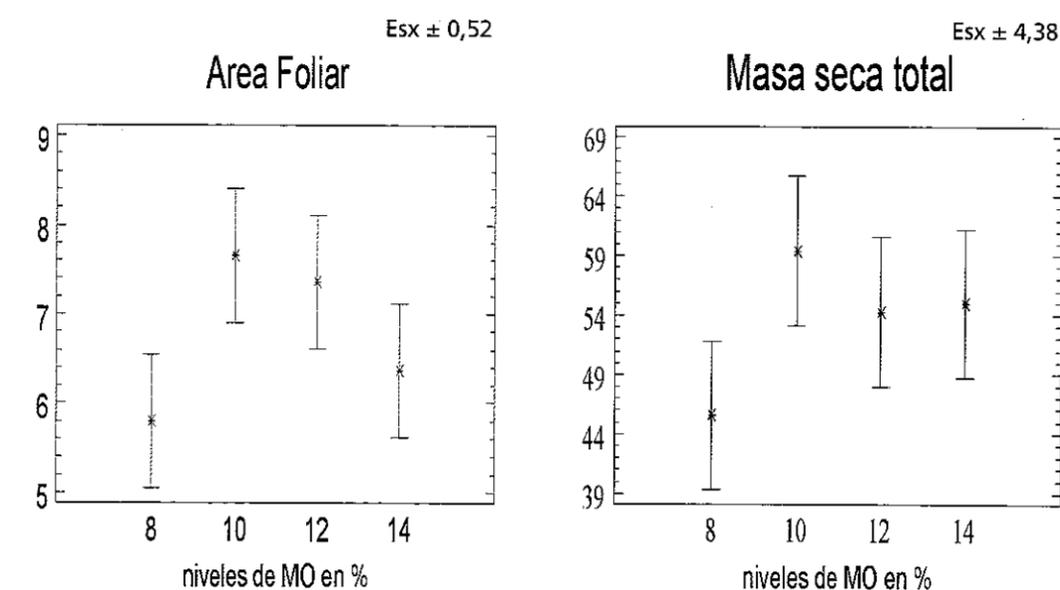


Figura 1. Comportamiento de los intervalos de confianza de las medias para el área foliar y el peso seco total, con un 95% de confiabilidad, para diferentes niveles (%) de materia orgánica (MO) en el sustrato. Intervalos que se solapan no difieren significativamente.

Figure 1 Behavior of the confidence intervals of mean values for the foliar area and the total dry weight, with 95% confidence level, according to different levels (%) of organic matter (MO) in the substrate. Overlapped intervals implicated not statistical significant differences.

Experimento 3

El resultado del análisis estadístico de los tratamientos se muestra en la tabla 6. Para los tres indicadores evaluados, los mejores resultados se ubican en los tratamientos donde se utiliza la pulpa de henequén o la mezcla de esta con suelo (tratamientos 1, 2, 3 y 4) y solamente los tratamientos con el suelo solo tuvieron un resultado significativo para el marco de 10 x 10 cm en cuanto al tamaño (tratamiento 5), coincidiendo estos resultados con los obtenidos por Otero (1999) referente a los factores marco de plantación y sustrato, recomendando marcos de 10 x 10 y 15 x 10 cm para establecer semilleros o pre viveros para el cultivo del henequén en propagación tradicional, con

la aplicación de enmiendas orgánicas al suelo consistentes en residuos de henequén descompuestos, datos que también confirman Eastmond et al., (2000).

Los beneficios atribuidos al uso de la pulpa como sustrato para establecer las plántulas de henequén para diferentes métodos de propagación, puede estar asociado con la riqueza mineral de este material, estando presente el calcio entre otros macroelementos como el nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio, dado que los terrenos para semilleros o viveros, deben ser según los conocimientos existentes en este cultivo, ricos en cal y de pH neutro o alcalino. En la Estación de Milingano, Otero, (1999) demostró que el Calcio es un elemento de vital importancia para los agaves, y en ausencia del mismo

Tabla 6. Resultados del procesamiento estadístico para cada indicador teniendo en cuenta la interacción entre los dos factores (tratamientos)
 Table 6. Results of the statistic processing for each indicator taking into account the interaction between the two factors (treatment)

Sustrato	Factores Marco de plantación	Tratamientos	Tamaño	Grosor	Nº. de hojas
P. henequén	10 x 10	1	18,40 ^{ab}	1,52 ^{ab}	6,26 ^a
fermentada	15 x 15	2	19,26 ^a	1,64 ^a	6,66 ^a
P. henequén fermentada	10 x 10	3	18,53 ^{ab}	1,64 ^a	6,4 ^a
más suelo. 1:1, v-v	15 x 15	4	19,73 ^a	1,66 ^a	6,66 ^a
Suelo	10 x 10	5	16,53 ^{bc}	1,33 ^{ab}	4,93 ^b
sólo	15 x 15	6	14,93 ^c	1,2b	4,33 ^b
Es x			0,82	0,11	0,27

Los tratamientos con letras diferentes difieren significativamente.
 Es x: error estándar de la media.

las plantas después del trasplante son incapaces de emitir raíces y mueren cuando se les acaban sus reservas nutritivas. Es importante señalar, que el cultivo del henequén a pesar de su rusticidad responde con incrementos significativos de su rendimiento cuando es tratado con abonos minerales.

El factor marco de plantación está fundamentalmente relacionado con la fitotecnia del cultivo para que la distancia entre las plantas permita el adecuado manejo cultural (limpieza y recolección), evitando así posibles lesiones por las espinas Otero (1999).

Conclusiones

La talla igual o mayor a 7 cm, en plantas de henequén, es óptima para su salida *in vitro* y comienzo del proceso de aclimatación.

El mejor sustrato para la aclimatación de plantas de henequén de acuerdo con las variantes estudiadas, es la de 10% de mate-

ria orgánica en la mezcla con una densidad de 0,66 g/cm³.

El desarrollo de las plántulas en la fase de vivero se favorece con el empleo de la pulpa de henequén fermentada como sustrato.

Referencias

- Agramonte PD, Jiménez T, Dita MA, 1998. Aclimatación. En: Propagación y Mejora de plantas por biotecnología. Pérez Ponce, J. N. (Ed). Instituto de biotecnología de las plantas. (Ed Geo). Santa Clara. Cuba. pp. 193-205.
- CUBA. MINAG., 1986. Dirección de Cultivos Varios. Instructivo Técnico del cultivo del henequén. La Habana: MINAG. 37 p.
- Dami L, Hughes HG, 1995. Leaf anatomic and water loss of *in vitro* PEG-Treated "Valliant" grape. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 42: 179,184 p.
- Debergh PC, Zimmerman RH, 1991. Micropropagation, technology and application. En: Micro-

propagation. Debergh PC, R H. Zimmerman (Eds) pp. 45-69.

De Faz A, De Cossio F, 1983. Lucha contra las enfermedades. Los Fungicidas. En: Principios de Protección de Plantas. Ed. Científico Técnica. Instituto superior de Ciencias Agrícola de la Habana. Cuba. pp. 211-222.

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

Enríquez del VR, Carrillo G, Sánchez P, Rodríguez M de las Nieves, Mendoza M del Carmen, 2000. Fertilización para la Óptima Adaptación Y Vigor de Plantas de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Obtenidos *in vitro*. *Fitotecnología Mexicana*. 23: 59-68.

González G, 2001. Embriogénesis somática en henequén (*Agave fourcroydes* Lem) Tesis presentada en opción al grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Matanzas. Cuba.

González G, Alemán S., Trujillo R, Domech R, Abreu E, Pérez Y, 2002. Influencia del 6-Benziladenina sobre el comportamiento *in vitro* de plantas de henequén obtenidas a partir de embriones. *Biotechnología Vegetal* 2: 235-238.

Kozai T, Fujiwara K, Giacomelly G, 1991. Environmental control in micropropagation. *Ann. Amer. Soc. Agr. Eng. Meeting*. 9: 11-13.

Madrigal LR, Pineda EF, Rodríguez de la O, JL, 1990. *Agave*. Handbook of Plant Cell Culture. Philip V. Ammirato, David A. Evans. William R. Sharp and Yashpal P.S. Bajaj. Vol. 5: Ornamental Species. MacGraw-Hill Publishing Co., New York. 206-227.

Murashige T, Skoog F, 1962. A revised médium for rapid growth and biassays with tobacco tissue culture. *Physiología Plantarum*. 15: 473-497.

Ortíz PR, 2000. Factores que afectan el desarrollo de plantas de caña de azúcar en la fase adaptativa. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba. 61 p.

Ortíz PR, De la Fé C, Lara D, 1998. Aportes a la tecnología de la micropropagación de la caña

de azúcar aplicada en Cuba. I. Sustratos más eficientes para la adaptación de plantas. *Cultivos Tropicales*. 19 (2): 45-50.

Ortíz R, De La Fe C, Lara L, 1998b. Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. III. Uso de fertilizantes y manejos de las plantas en la fase de adaptación. *Cultivos Tropicales* 19 (3): 49-53.

Otero BR, 1999. El cultivo del henequén (*Agave fourcroydes*, Lem) como planta textil y su aprovechamiento integral. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 3 (9): 23-46.

Otero BR, Valdez TC, Igarza SA, Rodríguez MZ, 2000. Efecto de la norma e intervalo de riego en el crecimiento y desarrollo del henequén (*Agave fourcroydes*, Lem). *Temas de Ciencia y Tecnología*. 4 (11): 45-47.

Paneque VM, 1998. Abonos orgánicos. Conceptos prácticos para su evaluación y aplicación. Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba. pp. 29.

Paneque VM, Calderón VM, Calaña JM, Caruncho CM, Hernández PY, Borges BY, 1999. Manual de Técnicas Analíticas para Análisis de Suelo, Foliar, Abonos Orgánicos y Fertilizantes Químicos. La Habana Ediciones. 92 p.

Peña E, González G, Berrillo A, Sosa D, Arteaga M, Rittoles D, Pérez D, Torriente Z, 1997. Tecnología para la micropropagación del Henequén a gran escala. *Jardín Botánico Nacional*. 17-18: 169-176.

Piven N, Barredo F, Borges I, Herrera M, Mayo A, Herrera L, Robert M, 2001. Reproductive biology of henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave Angustifolia* (Agavaceae) i. Gametophyte development. *American Journal of Botany*. 88: 1966-1976.

Pospisilová J, Catky J, Sesták Z, 1997. Photosynthesis in plant cultivate *in vitro*. En: Pessraki, M (ed). *Hanbook of Photosynthesis*. 525-540.

Pospisilova J, Wilhelmová N, Synková H, Catky D, Tichá I, Hanackovaa B, Snopek J, 1998. Aclimatación of tobacco plantlets to *ex vitro* conditions as affected by application of abscisic

- acid. *Journal of Experimental Botany*. (49) 322: 863-869.
- Pospisilová J, Haisel D, Synková H, Catsky J, Wilhermová N, Plzaková S, Prochazková D, Sramek F, 2000. Photosynthetic pigments and gas exchange during ex vitro acclimatization of tobacco plants as affected by CO₂ supply and abscisic acid. *Plant cell, tissue and Organ Culture*. 61: 125-133.
- Robert M.L. Ortiz R, Herrera JL, 1999. In vitro and ex vitro weaning: A key factor for field performance of micropropagated henequen (*Agave foveolatus* Lem) in A. Cassals (Ed.) *Methods and markers for Quality assurance in micropropagation*, University College, Cork Ireland. pp. 58-71.
- Robert ML, Herrera JL, Chan JL, Contreras F, 1992. Micropropagation of *Agave* spp. J:P:Y: Bajaj (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer-Verlag. 19: 306-329.
- Rodríguez R, 2000. Aclimatización de Plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum sp*, híbrido) Propagadas en Biorreactores de Inmersión Temporal. Tesis presentada en opción al grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila 95 p.
- Sallanon H, Tort M, Coudret A, 1993. The ultrastructure of micropropagated and green house rose plant stomata. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. 32: 227-233.
- Santamaría JM, Robert ML, Herrera JL, 1995. Stomatal Physiology of Micropropagated CAM plant; *Agave tequiliana* (Weber). *Plant Growth Regulation*. 16: 211-214.
- Van Huylenbroeck J, Debergh P, 1996. Physiological Aspects in Acclimatization of Micropropagated Plantlets. *Plant Tissue Culture and Biotechnological*. 2 (3): 136-141.
- Yanes PE, González OJ, Rodríguez SR, 2000. A Technology of Acclimatization of Pineapple vitroplants. *International society for Horticultural Science*. 66: 65-72.
- (Aceptado para publicación el 2 de febrero de 2007).