

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**“ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL INICIO
DEL CULTIVO *In Vitro* DE *Agave letonae* (HENEQUÉN) A
PARTIR DE YEMAS AXILARES”.**

**PRESENTADO POR:
OSCAR MAURICIO LÓPEZ LEÓN**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, FEBRERO DE 2013.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**“ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL INICIO
DEL CULTIVO *In Vitro* DE *Agave letonae* (HENEQUÉN) A
PARTIR DE YEMAS AXILARES”.**

**PRESENTADO POR:
OSCAR MAURICIO LÓPEZ LEÓN**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

ASESORA INTERNA:

M.Sc. YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA _____

ASESORA EXTERNA:

Inga. LINDEN LISSETTE ARIAS MARTÍNEZ _____

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, FEBRERO DE 2013.

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**“ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO PARA EL INICIO
DEL CULTIVO *In Vitro* DE *Agave letonae* (HENEQUÉN) A
PARTIR DE YEMAS AXILARES”.**

**PRESENTADO POR:
OSCAR MAURICIO LÓPEZ LEÓN**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

JURADO EXAMINADOR:

M.Sc. ZOILA VIRGINIA GUERRERO MENDOZA _____

Ing. CARLOS ROBERTO ARÉVALO ALVARADO _____

CIUDAD UNIVERSITARIA, SAN SALVADOR, FEBRERO DE 2013.

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTOR

Ing. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIA GENERAL

Dra. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FISCAL

Lic. FRANCISCO CRUZ LETONA

**DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y
MATEMÁTICA**

M.Sc. MARTÍN ENRIQUE GUERRA CÁCERES

SECRETARIO

Lic. CARLOS ANTONIO QUINTANILLA APARICIO

DIERCTOR DE LA ESCUELA DE BIOLOGÍA

Lic. RODOLFO FERNANDO MENJÍVAR

DEDICATORIA

Dedico este logro a Dios todo poderoso, por darme el conocimiento, las fuerzas y la paciencia necesaria requerida, para poder finalizar mi carrera universitaria con éxito.

A mis padres: Carlos Miguel López y Morena del Carmen León, por todos los esfuerzos que realizaron para poder finalizar mis estudios, estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos y todos los consejos que me dieron, infinitas gracias!

A mis hermanos: Carlos López y Eduardo López, por su apoyo y estar siempre a mi lado, gracias hermanos.

A mis familiares por siempre creer en mí y por toda su comprensión, gracias.

A mis amigos y amigas, por brindarme su amistad, palabras de apoyo para poder seguir adelante y sus buenos deseos, gracias.

Oscar López

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios todo poderoso, Familia y Amigos, por estar siempre a mi lado y brindarme todo su apoyo y cariño.

A mis asesoras: M.Sc. Yanira Elizabeth López Ventura e Inga. Linden Lissette Arias Martínez por haberme brindado todo su conocimiento, experiencia, paciencia y tiempo, para poder realizar mi trabajo de graduación.

A mis jurados: M.Sc. Zoila Virginia Guerrero Mendoza e Ing. Carlos Roberto Arévalo, por haber aceptado de forma voluntaria formar parte del equipo evaluador y ser parte fundamental en la realización y finalización de mi trabajo de graduación.

Al Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA), por haber permitido la realización de mí trabajo de graduación en el Laboratorio de Biotecnología. Al personal, en especial a: Licda. Karlita, Sra. Irma, Sra. Carmen, Ing. Borja y Don Mijango, por haberme brindado sus conocimientos y apoyo incondicional.

Oscar López

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	3
2.1. <i>AGAVE LETONAE</i> (HENEQUÉN).....	3
2.1.1. Características botánicas.....	4
2.1.2. Metabolismo.....	6
2.1.3. Requerimientos agroclimáticos y edáficos.....	7
2.1.4. Ciclo vegetativo.....	8
2.1.5. Propagación.....	8
2.1.6. Incidencia de plagas y enfermedades.....	9
2.1.7. Importancia económica.....	10
2.2. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE TEJIDOS VEGETALES.....	10
2.3. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i>	11
2.3.1. El explante.....	11
2.3.2. Método de desinfección.....	13
2.3.3. Medio de cultivo.....	14
2.4. HORMONAS.....	16
2.4.1. Auxinas.....	17
2.4.2. Citoquininas.....	18
2.4.3. Interacción entre citoquinina y auxina.....	18
2.5. ORGANOGÉNESIS.....	19
2.6. PROBLEMAS ASOCIADOS AL CULTIVO <i>IN VITRO</i>	20
2.6.1. Contaminación.....	20
2.6.2. Oxidación.....	21
2.6.3. Vitricación.....	22
2.7. FACTORES FÍSICOS QUE INTERVIENEN EN EL CULTIVO DE TEJIDOS.....	23
2.8. CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE MERISTEMOS EN <i>AGAVE</i>	24
3. METODOLOGÍA.....	26
3.1. UBICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	26
3.2. FASE DE CAMPO.....	27
3.2.1. Colecta de material vegetativo.....	27
3.3. FASE DE LABORATORIO.....	28
3.3.1. Preparación del medio de cultivo basal.....	28
3.3.2. Preparación del material vegetativo.....	30
3.3.3. Esterilización superficial de explantes.....	31
3.3.3.1. Siembra <i>In Vitro</i>	31
3.3.3.2. Variables que se evaluaron.....	33
3.3.3.3. Diseño experimental.....	33

3.3.3.4. Análisis estadístico.....	33
3.3.4. Establecimiento <i>In Vitro</i>	34
3.3.4.1. Preparación de medio de cultivo para el establecimiento <i>In Vitro</i>	34
3.3.4.2. Siembra <i>In Vitro</i>	35
3.3.4.3. Variables que se evaluaron.....	35
3.3.4.4. Diseño estadístico.....	35
3.3.4.5. Análisis estadístico.....	36
4. RESULTADOS.	37
4.1. ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DE YEMAS AXILARES DE <i>AGAVE LETONAE</i>	37
4.1.1. Porcentaje de sobrevivencia.....	37
4.1.2. Porcentaje de oxidación.....	38
4.1.3. Porcentaje de contaminación.....	38
4.2. ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE YEMAS AXILARES DE <i>AGAVE LETONAE</i>	41
4.2.1. Porcentaje de sobrevivencia.....	41
4.2.2. Porcentaje de contaminación.....	42
4.2.3. Porcentaje de oxidación.....	42
4.2.4. Porcentaje de vitrificación.....	44
4.2.5. Porcentaje de brotación.....	44
4.2.6. Días a brotación.....	46
4.3. PROTOCOLO PARA EL ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>AGAVE LETONAE</i> (HENEQUÉN) A PARTIR DE YEMAS AXILARES.	49
5. DISCUSION.....	51
5.1. ESTERILIZACIÓN SUPERFICIAL DE EXPLANTES.....	51
5.2. ESTABLECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE YEMAS AXILARES DE <i>AGAVE LETONAE</i>	53
6. CONCLUSIONES.	57
7. RECOMENDACIONES.....	58
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Componentes que conforman el medio formulado con sales Murashige y Skoog (1962) (CENTA 2008).....	28
Cuadro 2. Tratamientos de esterilización superficial de yemas axilares de <i>Agave letonae</i> , CENTA 2012.	31
Cuadro 3. Tratamientos para el establecimiento del cultivo <i>In Vitro</i> de yemas axilares de <i>Agave letonae</i> , en medio de cultivo basal Murashige y Skoog (1962), con diferentes combinaciones de BAP y AIB, CENTA 2012.	34
Cuadro 4. Análisis de varianza para porcentaje de brotación <i>In Vitro</i> de yemas axilares de <i>Agave letonae</i> , 56 días después de la siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.	45
Cuadro 5. Prueba de diferencia mínima significativa para porcentaje de brotación <i>In Vitro</i> de yemas axilares de <i>Agave letonae</i> , 56 días después de la siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.	45
Cuadro 6. Análisis de varianza para días a brotación <i>In Vitro</i> de yemas axilares de <i>Agave letonae</i> , 56 días después de la siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.	47
Cuadro 7. Prueba de diferencia mínima significativa para días a brotación <i>In Vitro</i> de yemas axilares de <i>Agave letonae</i> , 56 días después de la siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Agave letonae</i> , El Salvador 2012.....	3
Figura 2. a) Hoja provista de espinas en sus bordes, en <i>Agave letonae</i> . b) Ápice de hoja finalizando con una púa, en <i>Agave letonae</i> , CENTA 2012.	4
Figura 3. Sistema radical de <i>Agave letonae</i> , CENTA 2012.	5
Figura 4. a) Inflorescencia de <i>Agave letonae</i> . b) Escapo floral de <i>Agave letonae</i> , CENTA 2012.	6
Figura 5. a) y b) Plaga presente en planta de <i>Agave letonae</i> , CENTA 2012. .	9
Figura 6. Mapa de la ubicación geográfica del Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA) Departamento de la Libertad, El Salvador (Google Earth 2012).	26
Figura 7. a) Mapa de la ubicación geográfica del municipio de Comalapa. b) Mapa de la ubicación geográfica del municipio de Concepción Quezaltepeque. Ambos del Departamento de Chalatenango, El Salvador (Google Earth 2012).	27
Figura 8. Procedimiento para preparar medios de cultivo para el establecimiento <i>In Vitro</i> de <i>Agave letonae</i> . a) Medición de pH. b) Ebullición de medio de cultivo. c) Dispensado de medio de cultivo a frasco de un litro. d) Esterilización de medio de cultivo en autoclave. e) Agregación de Ridomil al medio de cultivo. f) Dispensado de medio de cultivo a tubos de ensayo, CENTA 2012.....	29
Figura 9. Procedimiento de preparación del material vegetativo de <i>Agave letonae</i> para su establecimiento <i>In Vitro</i> . a) Planta completa de <i>Agave letonae</i> . b) Eliminación de hojas y raíces. c) Cuerpo central de la planta. e) Extracción de yema axilar, CENTA 2012.	30

- Figura 10. Procedimiento para el establecimiento *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*. a) Yemas de *Agave letonae* en agua estéril. b) y c) Eliminación de partes dañadas por la desinfección. d) Introducción de yema al tubo de ensayo. e) Rotulación de tubo de ensayo. f) Gradillas con tubos de ensayo en el cuarto de crecimiento, CENTA 2012.....32
- Figura 11. a) y b) Supervivencia de yemas axilares de *Agave letonae*, siete días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.37
- Figura 12. a) y b) Oxidación de yemas axilares de *Agave letonae*, catorce días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.38
- Figura 13. a) Contaminación por bacterias en yemas axilares de *Agave letonae*, siete días después de establecido el cultivo *In Vitro*. b) Contaminación por hongo en yema axilar de *Agave letonae*, siete días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.39
- Figura 14. Porcentajes promedios de supervivencia, oxidación y contaminación *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, 56 días después de su siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.40
- Figura 15. a) Supervivencia de yema axilar de *Agave letonae*, 21 días después de establecido el cultivo *In Vitro*. b) Supervivencia de yema axilar de *Agave letonae*, 35 días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.41
- Figura 16. Porcentajes promedios de supervivencia *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, 56 días después de su siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.42
- Figura 17. a) Oxidación de yema axilar de *Agave letonae*, 49 días después de establecido el cultivo *In Vitro*. b) Oxidación de yema axilar de

<i>Agave letonae</i> , 56 días después de establecido el cultivo <i>In Vitro</i> , CENTA 2012.....	43
Figura 18. Porcentajes promedios de oxidación <i>In Vitro</i> de yemas axilares de <i>Agave letonae</i> , 56 días después de su siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.....	43
Figura 19. a) Vitrificación de yema axilar de <i>Agave letonae</i> , 35 días después de su establecimiento al cultivo <i>In Vitro</i> . b) Brote de <i>Agave letonae</i> vitrificado visto a través de estereoscopio, 49 días después de su establecimiento al cultivo <i>In Vitro</i> , CENTA 2012.....	44
Figura 20. Porcentajes promedios de brotación <i>In Vitro</i> de yemas axilares de <i>Agave letonae</i> , 56 días después de la siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.....	46
Figura 21. Días promedio a brotación <i>In Vitro</i> de yemas axilares de <i>Agave</i> <i>letonae</i> , 56 días después de la siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.....	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Hoja de toma de datos correspondiente a tratamientos de esterilización superficial de yemas axilares de <i>Agave letonae</i> , CENTA 2012.....	68
Anexo 2. Hoja de toma de datos correspondiente a tratamientos de interacción de reguladores de crecimiento BAP y AIB en medio de cultivo basal Murashige y Skoog (1962), CENTA 2012.	69
Anexo 3. Yemas de <i>Agave letonae</i> tratadas con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, en establecimiento del cultivo <i>In Vitro</i> , CENTA 2012.	72
Anexo 4. Valores de “T” de Student, (Reyes 1980).	73

RESUMEN

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA), con el objetivo de establecer un protocolo para el inicio del cultivo *In Vitro* de *Agave letonae* (henequén) a partir de yemas axilares. Se evaluaron tres tratamientos de esterilización superficial y en el establecimiento *In Vitro* se evaluó la combinación de reguladores de crecimiento como 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido indolbutírico (AIB) en diferentes concentraciones en medio basal Murashige y Skoog (1962). En la fase de esterilización superficial de yemas axilares, el análisis de varianza al 0.01%, no detectó diferencia estadística altamente significativa entre tratamientos, por lo que la desinfección de yemas axilares puede realizarse con cualquiera de los tres tratamientos evaluados. En la fase de establecimiento *In Vitro* el análisis de varianza al 0.01%, mostró diferencia estadística altamente significativa entre tratamientos, por lo que se determinó que el tratamiento T2 constituido por medio de cultivo MS basal, suplementado con 1.0 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIB; aceleró la brotación de yemas axilares a los 32 días promedio de la siembra *In Vitro*; se obtuvo un porcentaje promedio de brotación de 40%; se formaron brotes bien desarrollados que presentaron coloración verde oscura.

Palabras claves: *Agave letonae*, Henequén, Yemas axilares, Reguladores de crecimiento.

1. INTRODUCCIÓN

El henequén (*Agave letonae*), es una planta xerófila, con un ritmo de crecimiento lento, adaptada a vivir en condiciones climáticas desfavorables, con largos periodos de sequía y altas temperaturas, debido al metabolismo que presenta (García 2007).

Es un cultivo tradicional para las zonas del oriente del país, presenta una importancia económica que se le atribuye a la extracción de fibra a partir de sus hojas, siendo fuente de ingresos para muchas familias. A partir de la fibra de henequén se puede producir materia prima de uso industrial para la elaboración de sacos, tapetes, cuerdas etc.; así como para uso artesanal en la elaboración de alfombras, hamacas y cestos (Trade Consulting 2010; Contreras *et al.* 1979).

En los años setenta, El Salvador llegó a ser el principal productor de fibra de henequén en Centro América, en la actualidad la producción de fibras ha decaído en gran porcentaje por diversos factores que han provocado una reducción de cultivos de henequén y un aumento en la aparición de productos sustitutos como las fibras sintéticas; siendo cultivado el henequén únicamente por pequeños grupos de agricultores en la zona oriental del país, en donde la materia prima que obtienen no es suficiente para poder satisfacer la demanda nacional de fibra de henequén siendo de quince a diecisiete mil quintales anuales que es básicamente demandado por la fábrica AGAVE y que la oferta local solamente logra cubrir seis mil quintales, esta demanda la logra cubrir con las importaciones (Trade Consulting 2010).

Por lo que en la actualidad, es de importancia el incremento del cultivo de henequén en la zona oriental, para que se pueda dar una mayor producción de fibras burdas, pero la poca cantidad de plantas con que se cuenta es un problema para poder incrementar las plantaciones, incluyendo

que el único método de reproducción que utilizan los agricultores es por medio de hijuelos de rizoma, la planta los comienza a producir a partir del segundo año de haberlos sembrados con un promedio de quince hijuelos durante toda su vida, siendo así un factor que hace que el henequén sea difícil de multiplicar masivamente por este método (Trade Consulting 2010).

Una alternativa prometedora para la resolución de este problema es la utilización de la técnica de cultivo *In Vitro* de yemas axilares que permite la multiplicación masiva de plantas en un medio artificial, en condiciones asépticas. Esta técnica ya ha sido utilizada para conservar y multiplicar algunas especies del genero *Agave* con importancia económica o que se encuentran amenazadas o en peligro de extinción (Rodríguez *et al.* 2008; Salazar *et al* 2009).

Este trabajo consistió en el establecimiento de un protocolo para el inicio del cultivo *In Vitro* de henequén (*Agave letonae*) a partir de yemas axilares, el cual se realizó en dos fases: 1) seleccionar el tratamiento de desinfección superficial más apropiado para yemas axilares, haciendo uso de diferentes agentes desinfectantes y 2) combinación de reguladores de crecimiento como 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido indolbutírico (AIB) en diferentes concentraciones en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), como estrategia para obtención de brotes.

El Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA) podrá continuar con las siguientes etapas de la micropropagación, hasta la obtención de plantas completas sanas, a bajos costos y en un tiempo económicamente costeable, así se podrán beneficiar agricultores de diferentes municipios de la Zona Oriental de El Salvador al proporcionarles plantas, para que puedan incrementar sus cultivos de henequén, mejorar sus ingresos y por consiguiente habrá mayor producción de fibras burdas en el país, se podrá satisfacer la demanda local tanto industrial como artesanal y disminuir las importaciones de fibra de otros países.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. *Agave letonae* (henequén).

Pertenece al género *Agave*, el cual es derivado de una palabra griega que significa noble y que fue usada por Linneo, para designar un grupo de plantas que actualmente incluyen el henequén y otros *Agaves* de fibras duras o foliares, de textura dura y rígida, que se extienden a lo largo de los tejidos carnosos de las hojas largas o del peciolo (González y Abreu 2009; Sánchez 1991).

El henequén, 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 es excluida por la práctica habitual de cortar la inflorescencia, para evitar la influencia negativa que la floración causa a la calidad de la fibra (González *et al.* 2004).

➤ Ubicación taxonómica (Sánchez 1991):

Reino: Plantae
Clase: Angiospermae
Subclase: Monocotiledoneae
Orden: Liliiflorales
Familia: *Agavaceae*
Género: *Agave*
Especie: *letonae*
Nombre científico: *Agave letonae*
Nombre común: henequén, pita, magüey.



Figura 1. Planta de *Agave letonae*, El Salvador 2012.

2.1.1. Características botánicas.

Según Otero s.a.; González y Abreu 2009, las características botánicas de la planta de henequén son las siguientes:

➤ Tronco o tallo.

Puede alcanzar un diámetro central de veinte centímetros período a partir del cual no aumenta más, ocurriendo solamente el crecimiento en su parte inferior. El tronco constituye el eje de la planta donde se insertan las hojas y es un órgano donde hay una gran acumulación de sustancias de reserva.

➤ Meristemo.

Es la zona de la planta que se encuentra situada en la parte superior y que por división celular es la encargada del crecimiento, conjuntamente con el extremo de las raíces y los brotes laterales.

➤ Hojas.

Son carnosas, alargadas, rígidas y de un color verde-ceniza, provistas de espinas en sus bordes, finalizando en una púa resistente en su ápice. Se desarrollan a partir de la región meristemática del ápice del tallo, formándose varias yemas por año, en forma espiral, lo que da lugar a una roseta.



Figura 2. a) Hoja provista de espinas en sus bordes, en *Agave letonae*. b) Ápice de hoja finalizando con una púa, en *Agave letonae*, CENTA 2012.

➤ Raíces.

Posee un sistema radical fibroso desparramado, formando penachos sin raíz principal que se encuentra entre los 30 - 40 cm de profundidad. Las raíces surgen adventiciamente desde la base de las cicatrices de las hojas en el fondo del tallo y se clasifican en portadoras y alimentadoras en dependencia de su función.



Figura 3. Sistema radical de *Agave letonae*, CENTA 2012.

➤ Rizomas.

Son tallos subterráneos carnosos 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 conocidos como vástagos.

➤ Inflorescencia.

Es en racimo, cuyas flores se agrupan sobre un escapo que sale del centro de la planta. La floración del henequén tiene lugar después de los seis a diez y hasta veinte años, lo más común es observar que el henequén emite el escapo floral al final de su ciclo vegetativo, en esta etapa se observa cuando las hojas más jóvenes forman una roseta apretada, estrechas, afiladas y se van cortando a medida que comienza a emerger en el centro de la planta el escapo floral.



Figura 4. a) Inflorescencia de *Agave letonae*. b) Escapo floral de *Agave letonae*, CENTA 2012.

➤ Fruto y semilla.

Las flores dan origen a un fruto en forma de cápsula carnosa de color verde que al madurar ennegrece, dentro de este fruto aparecen semillas en número de 100 a 150, las cuales presentan apariencia papirácea, de forma triangular y de color negro cuando son fértiles.

➤ Bulbillos.

Debajo del pedúnculo floral se localizan yemas que al abortar la flor, dan origen a pequeñas plantas completas de origen asexual, denominadas bulbillos.

2.1.2. Metabolismo.

Presenta un metabolismo ácido crasuláceo (CAM), el cual es una especialización fisiológica en los *Agaves*, que les permite efectuar la fotosíntesis y sobrevivir en condiciones extremas de sequía. El henequén tiene transpiración nocturna, abre sus estomas en la noche, fija el carbono en ácidos orgánicos, principalmente ácido málico, que se acumula en las vacuolas; durante el día, el ácido málico es descarboxilado y se obtiene carbono, el cual es utilizado por la planta para la producción de carbohidratos. El metabolismo CAM permite obtener ganancias netas de carbono con una pérdida mínima de agua (García 2007; Moreno 1995).

Otro factor importante que contribuye a evitar la transpiración, es la gruesa capa de cutícula que cubre las pencas de la planta. Esta cubierta es transparente a fin de permitir la captura de energía solar para el proceso de fotosíntesis (Moreno 1995).

2.1.3. Requerimientos agroclimáticos y edáficos.

➤ Suelos.

En El Salvador el henequén se cultiva en terrenos arenosos, quebrados y pedregosos, cuya alcalinidad y textura los hace impropios para cultivos anuales. Están clasificados como latosoles arcillosos-rojizos, litosoles y alfisoles, fase pedregosa superficial de ondulada a montañosa, muy accidentada. La capa de suelo debe ser pobre en materiales orgánicos, rica en fosfato y carbonato de calcio, lo que le da mayor resistencia a la fibra. La alcalinidad de estos suelos los hace inapropiados para cultivos, tales como maíz y frijol. El henequén se desarrolla en terrenos que no es posible ararlos en forma mecánica ni rudimentaria (Contreras *et al.* 1979).

➤ Clima.

Prospera bien en clima seco, aunque cierto grado de humedad los favorece mucho. El henequén es capaz de vivir en este clima gracias a su resistencia a la sequía (Otero s. a.).

➤ Temperatura.

Puede soportar temperaturas atmosféricas elevadas, esto es debido a la capacidad de resistir la sequedad. Si las temperaturas fluctúan entre 27 a 32 grados Celsius y no bajan de 16 grados Celsius, el cultivo se encuentra en condiciones adecuadas para su desarrollo. El ritmo de crecimiento se ve retardado por causa de bajas temperaturas, debido que afecta la actividad meristemática, reduciendo además el contenido de fibras de la hoja y la emisión foliar (Otero s. a.).

➤ Precipitación pluvial.

El henequén es una planta resistente a la sequía, pero la carencia de precipitaciones afecta el buen desarrollo de este cultivo, retardando su crecimiento (Otero s.a.).

Requiere una precipitación pluvial de 691 milímetros anuales. Es decir, que es el tipo de cultivo que se adapta perfectamente a las zonas donde los periodos de sequía son prolongados (Contreras *et al.* 1979).

2.1.4. Ciclo vegetativo.

Solo florece una vez, y con esto termina su ciclo de vida, que es de 20 a 25 años. La etapa productiva, que consiste en la cosecha de la penca para su desfibrado, se inicia al cuarto año de haberse sembrado, el periodo más productivo tiene una duración de diez años aproximadamente, iniciándose a partir del sexto año de plantado (Contreras *et al.* 1979; Campos 1987).

2.1.5. Propagación.

➤ Reproducción sexual.

Es por medio de semillas, la cual se necesita mucho tiempo para el desarrollo de nuevas plantas, señalando que las semillas de los *Agaves* se usan raramente, debido a que la planta no las produce, a menos que las flores se polinicen artificialmente y que la propagación se realice por medio de vástagos o retoños, también se plantea que las plantas obtenidas no son de tamaño uniforme (González y Abreu 2009).

➤ Reproducción asexual.

- Rizomas.

El brote terminal del rizoma da lugar aproximadamente después de uno a dos años a un retoño que forma raíces adventicias, pudiendo así independizarse de la planta madre. Estas plantas, producidas asexualmente, se mantienen unidas a la planta madre hasta que son cortadas para emplearse en la siembra de nuevas plantaciones (González y Abreu 2009).

- Bulbillos.

Surgen de pequeños brotes protegidos por brácteas, cada bulbillo es una plántula que posee de seis a ocho hojas reducidas con un sistema radicular rudimentario, un escapo floral puede producir hasta 150 bulbillos (González y Abreu 2009).

2.1.6. Incidencia de plagas y enfermedades.

Las plagas de mayor importancia económica que atacan al cultivo de henequén son el picudo *Scyphophoros interstitialis* y la chicharrita del henequén *Homalodisca hambletoni*. Estos insectos generan un agotamiento prematuro y muerte de las plantas, por lo que en altas incidencias suelen reducir la densidad de plantas por unidad de superficie (Campos 1987).

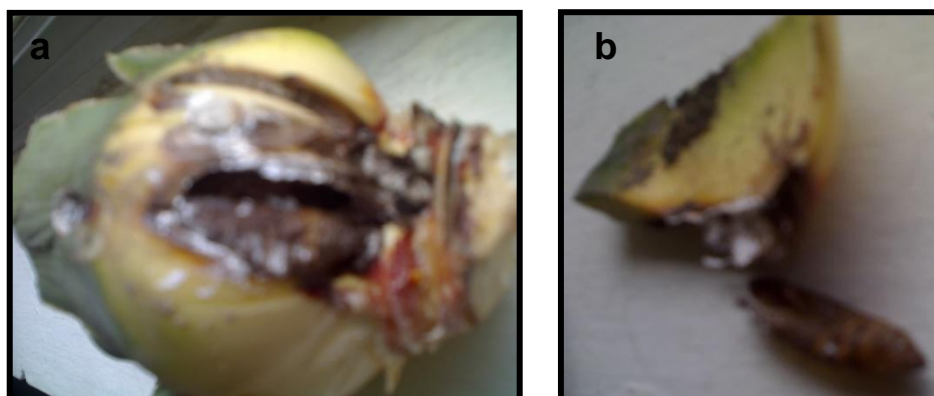


Figura 5. a) y b) Plaga presente en planta de *Agave letonae*, CENTA 2012.

Los principales agentes causantes de enfermedades en este cultivo son los hongos *Fusarium*, *Cercospora* y *Colletotrichum*, en donde generan manchas negras y blancas, afectando la calidad de la fibra. Es recomendable mantener las plantaciones libres de malezas ya que sirven de hospedero a plagas y hongos que reducen el ciclo vegetativo de la planta. Pueden ocasionar una disminución en la productividad del cultivo de 20 a 25 % (Campos 1987).

2.1.7. Importancia económica.

Las fibras que se extraen de las hojas de henequén se utilizan en la industria textil: en El Salvador se encuentra la fábrica AGAVE que se encarga de la fabricación de alfombras, sacos de uso agrícola, hilos y cuerdas. También a partir de las fibras se pueden elaborar artesanías, en la confección de hamacas, sombreros y cestos, que son excelentes por su flexibilidad y duración, así como por su resistencia al calor y a los insectos. Además de la producción de fibra, el henequén presenta una importancia en la preservación del paisaje y la erosión del suelo (León 1987; González y Abreu 2009).

2.2. Cultivo *In Vitro* de tejidos vegetales.

Es un conjunto de técnicas con las cuales se puede ejercer un control relativo sobre procesos morfogénicos, fisiológicos y bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudio. Abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos como de células y órganos, en donde se cultiva un explante con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de nutrientes y hormonas, se tiene una capacidad de regenerar no solamente tejidos y órganos, sino también una planta entera (Esquivel y Escalant 1994).

La técnica del cultivo *In Vitro* de tejidos vegetales es una secuencia de eventos asociados con la multiplicación de plantas y está conformada por tres etapas: Etapa I, donde se establece el cultivo inicial o primario; Etapa II, se realiza una multiplicación masiva de brotes; y Etapa III, que tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir a condiciones del trasplante a suelo esterilizado (Roca y Mroginski 1991; Anaya *et al.* s. a.; Rojas *et al.* s. a.; López *et al.* 2002; Mejía y Vittorelli 1988).

Según Domínguez *et al.* 2008; Esquivel y Escalant 1994, la micropropagación ofrece diferentes ventajas con respecto a los métodos convencionales:

- Se trata de un sistema de propagación clonal y se mantienen todas las características genotípicas del material seleccionado.
- El número de plantas que se pueden obtener a partir de un solo explante es prácticamente ilimitado.
- El espacio que se requiere es mínimo y el tiempo en que puede realizarse el proceso es corto.
- Se obtienen plantas libres de bacterias y hongos.

2.3. Establecimiento del cultivo *In Vitro*.

Es la primera etapa, llamada también fase de iniciación, en la cual se pretende obtener un explante de una planta maternal, que es seleccionada de una población en base a sus características fenotípicas y genotípicas, se pueden cultivar meristemos, ápices, yemas, etc. (Anaya *et al.* s. a; Toledo *et al.* 1998; Rojas *et al.* s. a.; Mejía y Vittorelli 1988; López *et al.* 2002).

Es la fase más importante desde el punto de vista aséptico, en la que se tiene que garantizar la supervivencia del explante en condiciones de laboratorio, donde se procede a desinfectarlo para establecerlo en un medio de cultivo apropiado, y evitar al máximo problemas de contaminación y oxidación que pueden causar la muerte del explante, para garantizar la calidad, uniformidad y vigor del material que será puesto en el mercado cuando concluya el proceso de producción (Anaya *et al.* s. a; Toledo *et al.* 1998; Rojas *et al.* s. a.; Mejía y Vittorelli 1988; López *et al.* 2002).

2.3.1. El explante.

Es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo. La elección de un explante apropiado constituye el paso para el establecimiento de los cultivos; puede ser un fragmento de cualquier parte de la planta (hoja, tallo, raíz, yemas, anteras, etc.). Al ser un método de clonación la planta madre debe reunir características deseables y

sobresalientes (López *et al.* 2002; Villalobos y Thorpe 1991; Roca y Mroginski 1991).

➤ Aspectos que se deben de tener en cuenta para el establecimiento *In Vitro* de un explante:

- Tamaño.

Cuanto más grande sea, mayores son las posibilidades de sobrevivencia y de obtener proliferación callosa, pero también las probabilidades de heterogeneidad y de contaminación con microorganismos son altas, y entre más pequeño sea el explante más reducidas son las probabilidades de sobrevivencia (Roca y Mroginski 1991; Suárez 1993).

- Edad fisiológica.

La edad fisiológica del explante es muy importante, ya que esto define su madurez o inmadurez (Suárez 1993; Rojas *et al.* s. a.).

- Fuente del tejido donde provenga.

Las condiciones internas y externas en que se encuentra la planta donante antes de iniciar el cultivo, pueden influir en el futuro desarrollo del explante. La planta donante del explante debe estar libre de enfermedades, no sufrir de estrés alguno al momento de obtener el explante, y preferiblemente debe estar en activo crecimiento (Suárez 1993; Rojas *et al.* s. a.).

Otro factor que puede alterar la respuesta de los explantes cultivados es la época del año en que se realizan los cultivos, especialmente cuando los explantes se obtienen de plantas de invernadero o campo (Roca y Mroginski 1991).

El explante debe responder eficientemente bajo las condiciones *In Vitro*. Es importante considerar el hecho de que el aislamiento de un tejido u órgano del resto de la planta provoca un estado de estrés que altera su

metabolismo celular, en forma importante su balance hormonal. Un buen explante es aquel cuyas células sobreviven, en una alta proporción a la descomposición y que luego eficientemente a las condiciones *In Vitro* (Villalobos y Thorpe 1991).

2.3.2. Método de desinfección.

Una vez seleccionado el mejor explante se requiere desinfectarlo superficialmente porque en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán ventajosamente con el explante. Evitar las contaminaciones con microorganismos es un aspecto que se debe tener en cuenta para el éxito, no solamente en el establecimiento de los cultivos sino en su incubación y manipulación (Villalobos y Thorpe 1991; Roca y Mroginski 1991).

La selección y concentración de desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan en gran medida, por las características del explante; en la práctica, se establecen experimentalmente por ensayo y error (Villalobos y Thorpe 1991).

El procedimiento de desinfección superficial del explante debe eliminar los microorganismos pero a la vez debe causar el menor daño posible al explante. Varios compuestos se han recomendado y entre los más usados están el hipoclorito de sodio (cloro comercial del dos al cinco porciento) y de calcio (del seis al doce porciento) que se recomienda como menos tóxico y el etanol (70%). También se ha recomendado la adición de un detergente (dos a cuatro gotas de Tween-20) para romper la tensión superficial y permitir que el explante esté en mejor contacto con el químico. El uso de antibióticos se recomienda como última alternativa para limpiar los explantes (Esquivel y Escalant 1994).

Para facilitar la limpieza del explante es importante considerar que los brotes nuevos son más limpios que los viejos, materiales que crecen en

invernaderos son más limpios que los que se mantienen en el campo y entre más pequeño sea el explante a introducir a cultivo *In Vitro* menor será la contaminación a eliminar, sin embargo, el tamaño debe ser tal que facilite el establecimiento del tejido (Esquivel y Escalant 1994).

2.3.3. Medio de cultivo.

Es una solución nutritiva que contiene sales inorgánicas (minerales), elementos orgánicos (vitaminas, aminoácidos, carbohidratos) y materiales inertes. Preparada para el crecimiento de tejidos vegetales *In Vitro*, puede ser líquido o sólido (Rojas *et al.* s.a.; Romero y Escobar 1999; Berthoul y Berrios 1987; Esquivel y Escalant 1994).

➤ Sales inorgánicas.

- Macronutrientes.

Los tejidos en cultivo requieren de una fuente continua de compuestos inorgánicos. Además de carbono, hidrogeno y oxígeno, los elementos más requeridos son principalmente: N, P, K, Ca, Mg y S (Rosell y Villalobos 1990).

- Micronutrientes.

Para una adecuada actividad metabólica las células vegetales requieren de micronutrientes. Los más esenciales son: Fe, Mn, Zn, Bo, Cu, Co y Mo. Los últimos cinco elementos son fundamentales para la síntesis de clorofila y la función de los cloroplastos (Rosell y Villalobos 1990).

Una de las mezclas de sales más usadas es la descrita por Murashige y Skoog (1962). Esta es conocida como MS (Esquivel y Escalant 1994).

➤ Compuestos orgánicos.

En esta categoría se encuentran sustancias como carbohidratos, hormonas o reguladores de crecimiento, vitaminas y algunos otros compuestos que se han descrito como beneficiosos para el cultivo de tejidos:

aminoácidos, amidas, purinas, pirimidinas y ácidos orgánicos (Esquivel y Escalant 1994).

- Carbohidratos.

Sustancias orgánicas como los azúcares que proveen tres de los elementos mas esenciales: hidrogeno (H), Carbono (C) y Oxígeno (O). Son utilizados como fuente de energía y como reguladores osmóticos, la sacarosa es el azúcar empleado universalmente, le siguen en importancia glucosa, maltosa, rafinosa, fructosa, galactosa, manosa y lactosa. La concentración que se utiliza de sacarosa es de 20 a 45 g/l (Esquivel y Escalant 1994; Rosell y Villalobos 1990).

Los azúcares son producto de la fotosíntesis, proceso por medio del cual la planta convierte el dióxido de carbono y agua en carbohidratos con la ayuda de la clorofila y la luz. Sin embargo, las plantas que crecen *In Vitro*, debido a la baja intensidad lumínica, no pueden fabricar todo el azúcar que requieren, por lo que se adicionan altas concentraciones de sacarosa al medio de cultivo (Esquivel y Escalant 1994).

- Vitaminas.

Compuestos que normalmente la planta necesita para completar su desarrollo, las que más se incluyen en la preparación de medios de cultivo son: tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, biotina, pantotenato y riboflavina. Son necesarias para llevar a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo y son requeridas en pequeñas cantidades (Rojas *et al.* s. a.; Esquivel y Escalant 1994; Rosell y Villalobos 1990).

- Aminoácidos.

Ningún aminoácido es esencial para el crecimiento de tejidos *In Vitro*, sin embargo, existen varios que se han utilizado experimentalmente. Los aminoácidos proporcionan una fuente inmediata de nitrógeno al tejido y su asimilación puede ser más rápida que el nitrógeno inorgánico proporcionado por el medio (Rosell y Villalobos 1990).

➤ Materiales inertes.

El agar es un sistema de soporte para la preparación de medios sólidos o semisólidos. Las ventajas que representa son:

- Es un gel estable a todas las temperaturas de incubación.
- No es alterado por las enzimas vegetales.
- No reacciona con los constituyentes del medio.

Por lo general el medio de cultivo se esteriliza en el autoclave a una presión de 115 lb/pulg². (121°C) durante veinte minutos. Sin embargo, el tiempo de esterilización dependerá del volumen de medio (Esquivel y Escalant 1994).

2.4. Hormonas.

Son compuestos que se sintetizan naturalmente dentro del tejido de la planta y cumplen un rol regulatorio más que nutricional en el crecimiento y desarrollo. Estos compuestos generalmente activos a muy bajas concentraciones fomentan, inhiben o modifican de alguna manera cualquier proceso fisiológico vegetal, son conocidos como sustancias de crecimiento, fitohormonas u hormonas vegetales. Los químicos sintéticos con similar actividad fisiológica para modificar el crecimiento y desarrollo de la planta, son denominados como reguladores de crecimiento (Mejía y Vittorelli 1988; Fernández 2002).

Las sustancias hormonales críticas en el cultivo de tejidos son las auxinas y las citoquininas. Estas intervienen en la elongación y división celular, formación de brotes, raíces y en la germinación de semillas. Las concentraciones varían de especie a especie, pero generalmente las auxinas se usan en una concentración de 0.1 a 10.0 mg/l y las citoquininas de 0.03 a 30.0 mg/l (Esquivel y Escalant 1994; Hurtado y Merino 1987).

2.4.1. Auxinas.

Se sintetizan en ápices de tallos jóvenes, por lo tanto tienen efecto en la dominancia apical y formación de órganos. Tienen movimientos basipétalo (descendente), comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular tanto en yemas existentes como en la emergencia de yemas adventicias, también promueven el enraizamiento, tienen efecto en la síntesis de enzimas del ácido ribonucleico (ARN) de proteínas y en la permeabilidad celular. Sin embargo, se ha encontrado al mismo tiempo que promueven la división celular en el cultivo de tejidos (Roca y Mroginski 1991; Mejía y Vittorelli 1988).

Existen varias auxinas naturales, que incluyen: ácido indolacético (AIA), indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, indol-3-carboxialdehído, indol-3-acetaldehído, indol-3-acetamida, ácido indol-3-carboxílico, ácido indol-3-propionico, ácido 5-hidroxiindol-3-acético, ácido indol-3-acetilas-partco (Roca y Mroginski 1991).

También se utilizan ampliamente un buen número de auxinas sintéticas que provocan un efecto fisiológico similar a las auxinas naturales, entre las cuales el 2,4-D, el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido indolbutírico (AIB) se encuentran ampliamente disponibles y se utilizan comúnmente (Roca y Mroginski 1991).

Las auxinas son ampliamente usadas en trabajos de micropropagación y son incorporados al medio de cultivo para estimular el crecimiento de callos, suspensión de células u órganos (meristemos, tallos o ápices de raíces) y para regular la morfogénesis, especialmente en interacción con citoquininas (Mejía y Vittorelli 1988).

2.4.2. Citoquininas.

Son sustancias de crecimiento que provocan la división celular, se producen en las raíces y se traslocan hacia los brotes y hojas, tienen movimientos acropétalo (ascendente). Las citoquininas son muy importantes para la regulación del crecimiento y morfogénesis en cultivos de tejidos, inducen la organogénesis, estimulan el rompimiento de la latencia de yemas axilares, inhibición en el desarrollo de raíces laterales, por lo que son antagonistas de la rizogénesis, estimulan el metabolismo favoreciendo la síntesis proteica y finalmente presentan un efecto antagonista de dominancia apical (Mejía y Vittorelli 1988; Roca y Mroginski 1991; Toro 2004).

Existen citoquininas naturales como la zeatina, que promueve el crecimiento de yemas dormantes y activa la división celular. Una forma común de agregar esta citoquinina natural al medio de cultivo, es con suplementos orgánicos como extracto de levadura o agua de coco (Mejía y Vittorelli 1988; Toro 2004).

También se pueden mencionar citoquininas sintéticas como: kinetina (KIN), 6-bencilaminopurina (BAP) y 6-isopenteniladenina (2ip) (Mejía y Vittorelli 1988; Toro 2004).

2.4.3. Interacción entre citoquinina y auxina.

Algunos aspectos de diferenciación celular, organogénesis en tejidos y cultivo de órganos, son controlados por la interacción entre la concentración de citoquinina y auxina (Mejía y Vittorelli 1988).

Un balance entre auxinas y citoquininas, como reguladores de crecimiento, es más frecuentemente requerido para la formación de tallos y raíces. Las concentraciones adecuadas de cada tipo de reguladores difieren grandemente de acuerdo a la clase de explante inicial, a las condiciones del cultivo y los componentes usados (Mejía y Vittorelli 1988).

Las citoquininas son constituyentes del ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) y de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) tienen interacción sinérgica con las auxinas. Las hormonas pueden manipularse variando su nivel relativo; las proporciones altas de auxina en relación con la citoquinina en el medio de cultivo, estimulan la formación y el crecimiento de raíces, en tanto que proporciones intermedias provocan la formación y crecimiento de callos; y la proporción alta de citoquinina en relación con la auxina, tiende a promover la formación y crecimiento de brotes (Mejía y Vittorelli 1988; Suárez 1993).

2.5. Organogénesis.

Comprende el desarrollo de yemas o de meristemos radicales a partir de los explantes directamente o a partir de callos. Se refiere a la vía de morfogénesis que sigue el explante para llegar a convertirse en plántula (Litz y Jarret 1991; Rojas *et al.* s. a.).

- Organogénesis directa.

Consiste en la generación de plantas sin raíces directamente del explante, las células de un órgano o tejido aislado se desdiferencian primero para posteriormente formar tejidos. A partir de estos se forman rápidamente órganos (raíces o brotes), esta ruta generalmente se sigue cuando se utilizan meristemos vegetativos terminales o laterales (Rojas *et al.* s. a.; Gómez 2002).

- Organogénesis indirecta.

El explante genera la formación de una masa indiferenciada de células llamada callo, a partir de este se forman partes vegetativas diferenciadas como brotes o raíces, de las cuales se obtiene la plántula según sea la especie y las hormonas utilizadas. Este es el caso principalmente del cultivo de protoplastos (Rojas *et al.* s. a.).

Orellana 1998 citado por Paiz 2006, menciona que la micropropagación vía organogénesis utilizando yemas axilares se ha demostrado en muchas especies, como el método más confiable para lograr un proceso repetible sin alteraciones genéticas y libres de contaminantes.

2.6. Problemas asociados al cultivo *In Vitro*.

2.6.1. Contaminación.

Según Debergh y Zimmerman 1991, citado por Afanador 2005, mencionan que la presencia de microorganismos en el cultivo *In Vitro* reduce el éxito de los resultados, especialmente durante la etapa de establecimiento. Esta situación se genera por las condiciones físicas del cultivo que conforman un ambiente propicio para su desarrollo.

La presencia de microorganismos contaminantes en la fase de establecimiento *In Vitro* ocurre sobre todo, cuando la planta donante crece directamente en el campo y esta expuesta a plagas, enfermedades, polvo y otros agentes, sin ningún tipo de control ambiental (Ramírez y Salazar 1997).

La mayor parte de contaminación en el cultivo *In Vitro* de tejidos vegetales se produce por la presencia de microorganismos superficiales y sistémicos de la planta donadora. Los principales microorganismos asociados a las superficies de las plantas son hongos y bacterias, algunos de estos microorganismos se expresan con rapidez y son fáciles de detectar mediante inspecciones rutinarias, pero otros permanecen latentes hasta que las condiciones sean favorables, como la transferencia de los explantes a un medio nuevo, especialmente cuando se reducen las concentraciones de sales y de azúcar en el medio de cultivo (Afanador 2005; Gómez 2002).

2.6.2. Oxidación.

La oxidación u oscurecimiento de tejidos cultivados *In Vitro*, se puede definir como la degradación por radicales libres, de diferentes componentes celulares, así como la oxidación de compuestos fenólicos catalizados por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas, las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar. Los explantes frecuentemente se tornan marrones o negruzcos poco después del aislamiento y cuando esto ocurre, se inhibe el crecimiento, generando daño y el tejido generalmente muere. Los tejidos jóvenes son menos susceptibles al oscurecimiento que los más maduros (Toledo *et al.* 1998; Azofeifa 2009).

En el caso particular del cultivo de tejidos *In Vitro*, los procesos de oxidación son causados principalmente por el efecto abrasivo del agente desinfectante aplicado durante la asepsia. Tales efectos se pueden disminuir reduciendo la duración del proceso de esterilización del explante o con la sustitución del agente desinfectante (Azofeifa 2009).

La producción de compuestos fenólicos se estimula cuando las plantas se exponen a situaciones de estrés, como pueden ser los daños mecánicos que se producen al aislar los explantes de la planta madre. El ennegrecimiento de los tejidos se produce por la acción de enzimas oxidasas que son exudadas y sintetizadas por tejidos heridos (Gómez 2002; Afanador 2005).

Según George 1996, citado por Azofeifa 2009, La producción de polifenoles está influenciada por los reguladores de crecimiento agregados al medio de cultivo. No obstante, su efecto y relación con el oscurecimiento de explantes no es consistente, pues un mismo regulador que induce oscurecimiento en una especie, en otra no tiene igual efecto. Las auxinas y las citoquininas son los grupos de reguladores de crecimiento más relacionados con el problema de oscurecimiento de explantes. Dentro de las auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y en las citoquininas, la 6-

bencilaminopurina (BAP), son los reguladores que cuentan con un mayor número de referencias que asocian su uso con el problema de oxidación.

Según George 1996, citado por Azofeifa 2009, la presencia de sustancias fenólicas en el medio de cultivo liberadas por el explante, tienen un efecto autocatilítico. Por lo que la remoción o dispersión de las mismas se considera un método de control efectivo a través de la realización de subcultivos frecuentes a medio fresco en poco tiempo. El intervalo entre subcultivos se debe ajustar según la severidad del problema, con frecuencia es necesario transferir al inicio, a intervalos de uno a siete días, requiriéndose normalmente entre cinco y seis subcultivos para que la producción u oxidación de fenoles cese.

2.6.3. Vitrificación.

También se denomina hiperhidricidad, traslucidez, transformación hiperhídrica, glaucosidad y vitrosidad. Es un desorden fisiológico que se presenta en ciertas especies de plantas, caracterizado por el desarrollo de tejidos vítreos, translúcidos, hiperhidratados y suculentos, producto de condiciones no adecuadas de cultivo y de difícil sobrevivencia al trasplante (Toro 2004; Gómez 2002).

Este fenómeno se caracteriza por presentar una enorme cantidad de agua en los tejidos de las hojas y tallos, afecta los procesos de fotosíntesis e intercambio gaseoso. Los brotes y raíces también pueden manifestar una anatomía anormal y por lo tanto impedir el establecimiento de plantas micropropagadas a *Extra Vitrum*. La responsabilidad de estos desórdenes fisiológicos puede atribuirse a la composición y la consistencia del medio de cultivo: un bajo contenido en agar, especialmente en cultivos de medio líquido causando un exceso de humedad; un exceso de factores nutricionales, altos niveles de reguladores de crecimiento y baja intensidad luminosa. Los factores clave de la vitrificación son la humedad relativa y el potencial hídrico dentro del medio de cultivo (Toro 2004; Gómez 2002).

Según Reuther 1988, citado por Gómez 2002, la saturación de vapor de agua y la acumulación de etileno y CO₂ en recipientes de cultivo sellados, se considera que tienen también un efecto en el grado de vitrificación.

Según Toro 2004, las medidas que se utilizan para disminuir los problemas de vitrificación son:

- a) Incrementando la concentración de agar y/o sacarosa en el medio de cultivo.
- b) Regulando los niveles de citoquinina.
- c) Aumentando la intensidad luminosa.

2.7. Factores físicos que intervienen en el cultivo de tejidos.

Según Esquivel y Escalant 1994, los factores físicos que intervienen en el cultivo de tejidos son los siguientes:

- pH.

El grado de acidez o alcalinidad (pH) del medio de cultivo es importante y específico para cada tipo de plantas, al igual que ocurre en el suelo, por lo que se hace necesario ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio, sin embargo, el pH adecuado estará en un rango de 4.5 a 7.0 para las plantas.

- Intercambio gaseoso.

Los gases más comunes son O₂ (oxígeno), CO₂ (dióxido de carbono), y C₂H₄ (etileno).

- La humedad.

En condiciones *In Vitro* la humedad dentro de los recipientes es casi 100%. Por eso la planta *In Vitro* en general no desarrolla adecuados sistemas de regulación hídrica tales como cera, estomas, cutícula, etc.

- La luz.

En condiciones *In Vitro*, la intensidad y calidad de la luz es muy baja (10 W/m^2 en comparación de condiciones naturales donde la luz puede representar hasta 900 W/m^2) y se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala para tener diferentes longitudes de ondas. El espectro útil para los vegetales es de 400 a 700 nanómetros.

2.8. Cultivo *In Vitro* de meristemos en *Agave*.

El cultivo *In Vitro* de meristemos axilares y apicales, es una estrategia que permite la multiplicación masiva de plantas, es de gran importancia por dos razones; la primera porque siendo tejidos ya organizados presentan una gran estabilidad genética, la segunda es, que los meristemos apicales se encuentran por lo general libres de patógenos, son extremadamente pequeños (0.8 mm) y se desarrollan directamente en tallos (López *et al.* 2002; Salazar *et al.* 2009, Villalobos y Thorpe 1991).

El cultivo de meristemos, con el propósito de observar el crecimiento de plántulas completas, se utiliza especialmente con fines de saneamiento de plantas enfermas (Mejía y Vittorelli 1988).

Salazar *et al.* 2009, mencionan que en el cultivo *In Vitro* utilizando yemas axilares en un medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con bencilaminopurina (BA) 1.0 mg/l y ácido naftalenacético (ANA) 1.0 mg/l, es un método eficiente para propagar *Agave cocui* Trelease, porque todas las plantas que se logran obtener tienen una morfología normal.

Villalobos *et al.* 1991, reportan que el medio de cultivo para el establecimiento *In Vitro* de yemas axilares de *Agave atrovirens*, es el Murashige y Skoog (1962), suplementado con Kinetina (KIN) 1.0 mg/l y ácido indol-3-acético (AIA) 0.5 mg/l, observando brotación a partir de las tres semanas de su siembra *In Vitro*.

Garriga *et al.* 2010, mencionan que en la etapa de establecimiento *In Vitro* de ápices de *Agave fourcroides* Lem, la combinación de 6-bencilaminopurina (BAP) 0.75 mg/l y ácido indolbutírico (AIB) 1.0 mg/l en lugar de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), mejoró significativamente la supervivencia de los explantes y la brotación.

González *et al.* 2004, realizaron un estudio sobre el cultivo *In Vitro* como alternativa para la recuperación henequenera (*Agave fourcroydes*). Se evidencia que con la propagación *In Vitro* se logra estabilidad genética. Los rendimientos en fibra de las plantas propagadas *In Vitro* fueron superiores y la cosecha se realizó a los tres años, tiempo inferior a los cinco requeridos para las plantas propagadas tradicionalmente.

3. METODOLOGÍA.

3.1. Ubicación y descripción del área de estudio.

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA), ubicado en el Kilómetro 33 ½ de la carretera Panamericana, cantón San Andrés, municipio de Ciudad Arce, Departamento de la Libertad a 450 msnm, con una Latitud Norte de 13°5' y una Longitud Oeste de 89°26' con valores de temperatura promedio de 28°C, humedad relativa de 69% y precipitación de 1700 mm anuales (Quintanilla 2003).

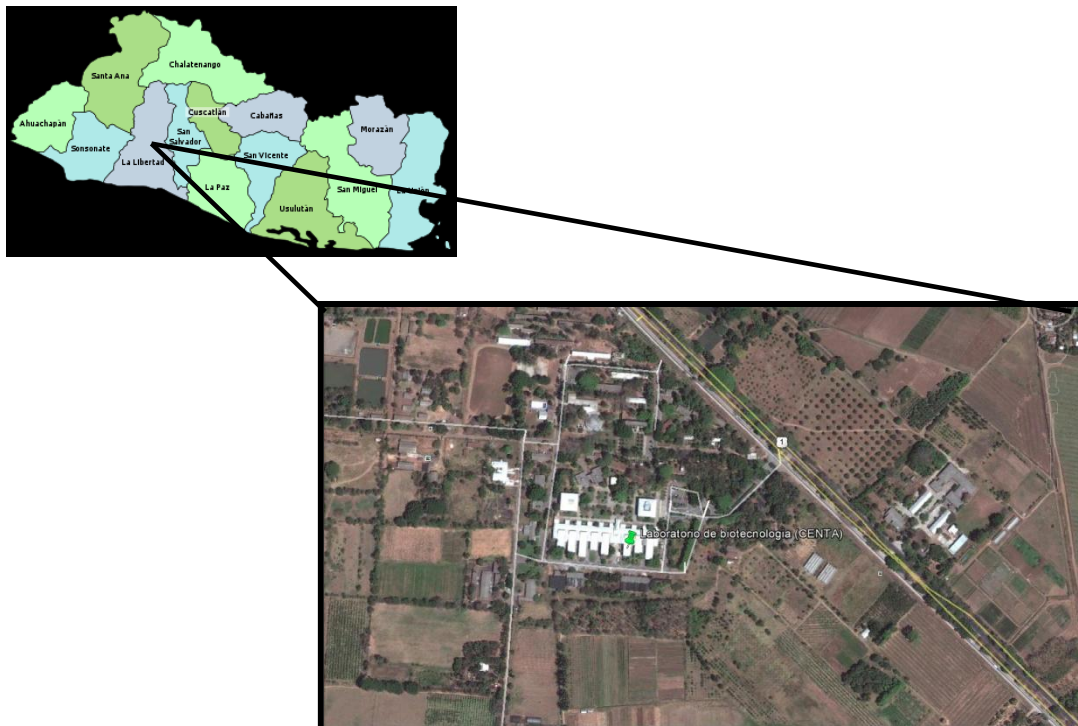


Figura 6. Mapa de la ubicación geográfica del Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA) Departamento de la Libertad, El Salvador (Google Earth 2012).

3.2. Fase de campo.

3.2.1. Colecta de material vegetativo.

El material vegetativo que se utilizó para esta investigación fueron plantas completas de henequén. Se seleccionaron dos zonas de colecta, donde se tomaron puntos georeferenciados utilizando un GPS marca Garmin Etrex, El primer punto de colecta fue en el cantón la Junta del municipio de Comalapa, con una Latitud Norte 14°8' y una Latitud Oeste 88°57'; El segundo punto de colecta fue en el cantón el Rosario del municipio de Concepción Quezaltepeque, con una Latitud Norte 14°5' y una Latitud Oeste 88°57' ambos del Departamento de Chalatenango, El Salvador.

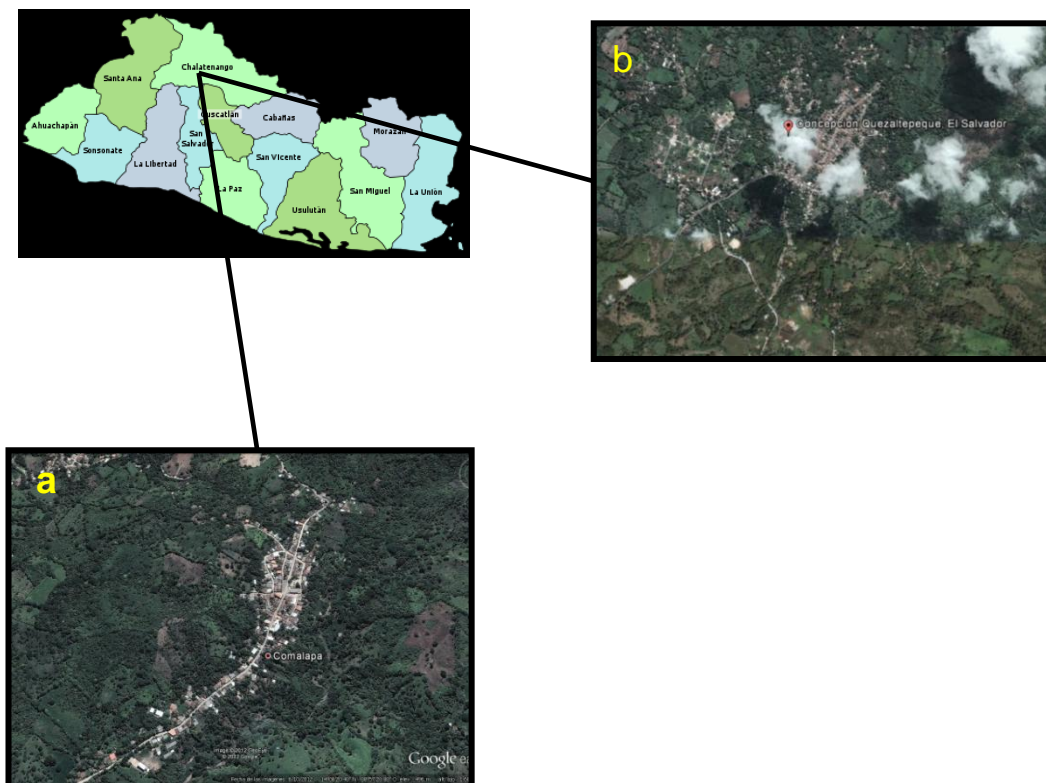


Figura 7. a) Mapa de la ubicación geográfica del municipio de Comalapa. b) Mapa de la ubicación geográfica del municipio de Concepción Quezaltepeque. Ambos del Departamento de Chalatenango, El Salvador (Google Earth 2012).

3.3. Fase de Laboratorio.

3.3.1. Preparación del medio de cultivo basal.

Para la preparación del medio de cultivo basal se utilizaron soluciones madres de los diferentes componentes que conforman el medio formulado con sales Murashige y Skoog (1962): sales inorgánicas como macronutrientes y micronutrientes, suplementado con compuestos orgánicos como vitaminas y azúcar, como se indica en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Componentes que conforman el medio formulado con sales Murashige y Skoog (1962) (CENTA 2008).

Nº	Soluciones madres	Concentración	g/l	Cantidad requerida para medio de cultivo
I	NH₄NO₃	100X	165	10 ml/l
II	KNO₃	100X	190	10 ml/l
III	CaCl₂.2H₂O	100X	44	10 ml/l
IV	MgSO₄.7H₂O	100X	37	10 ml/l
V	KH₂PO₄	100X	17	10 ml/l
VI	Na₂EDTA	100X	3.73	10 ml/l
	FeSO₄.7H₂O	100X	2.78	
VII	Microelementos		mg/l	10 ml/l
1	H ₃ BO ₃	100X	620	
2	MnSO ₄ .H ₂ O	100X	1560	
3	ZnSO ₄ .7H ₂ O	100X	860	
4	KI	100X	83	
5	NaMoO ₄ .2H ₂ O	100X	25	
6	CuSO ₄ .5H ₂ O	100X	2.5	
7	CoCl ₂ .6H ₂ O	100X	2.5	
VIII	Vitaminas		mg/l	10 ml/l
1	Glicina	100X	200	
2	Ácido nicotínico	100X	50	
3	Piridoxina	100X	50	
4	Mioinositol	100X	10	
5	Tiamina	100X	10	
	Azúcar			30 g/l
	Agar			8 g/l

Se midió el pH= 5.7, luego se agregó 8.0 g/l de agar como agente gelificante (Salazar *et al.* 2009). Se llevo a ebullición el medio de cultivo para disolver el agar. Después se procedió a dispensar el medio de cultivo en frascos de vidrio de un litro, se esterilizó junto con todos los utensilios como pinzas, papel, agua deionizada, etc. en el autoclave a una presión de 115 lb/pulg², a una temperatura de 121°C por veinte minutos (Esquivel y Escalant 1994). En cámara de flujo laminar se procedió a agregar 50 mg/l de Ridomil (Mefenoxam y Mancozeb) al medio de cultivo, al final se dispensó 10 ml a 135 tubos de ensayo.

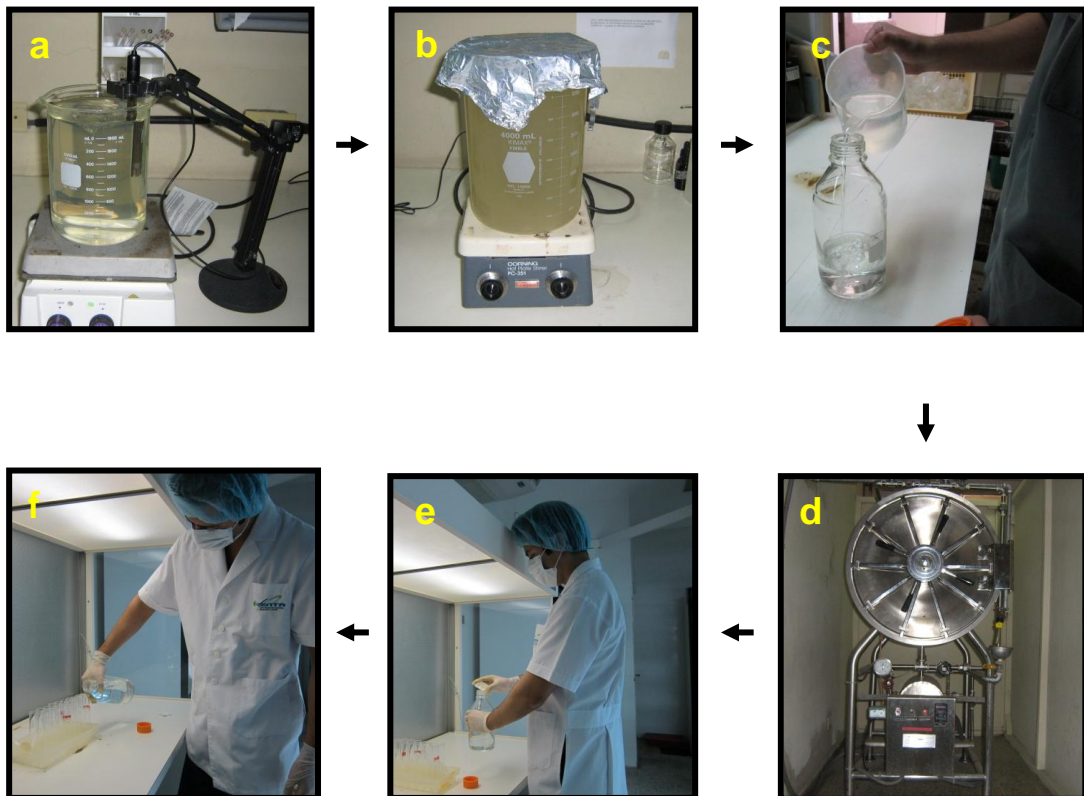


Figura 8. Procedimiento para preparar medios de cultivo para el establecimiento *In Vitro* de *Agave letonae*. a) Medición de pH. b) Ebullición de medio de cultivo. c) Dispensado de medio de cultivo a frasco de un litro. d) Esterilización de medio de cultivo en autoclave. e) Agregación de Ridomil al medio de cultivo. f) Dispensado de medio de cultivo a tubos de ensayo, CENTA 2012.

3.3.2. Preparación del material vegetativo.

Para la obtención de los explantes, las plantas fueron transportadas de su lugar de colecta al laboratorio. Donde se procedió a eliminar las hojas y raíces, dejando solo el cuerpo central de la planta, de la cual se aislaron las yemas axilares con una pequeña porción de tejido de aproximadamente 0.8-1.0 cm (Rodríguez *et al.* 2008).

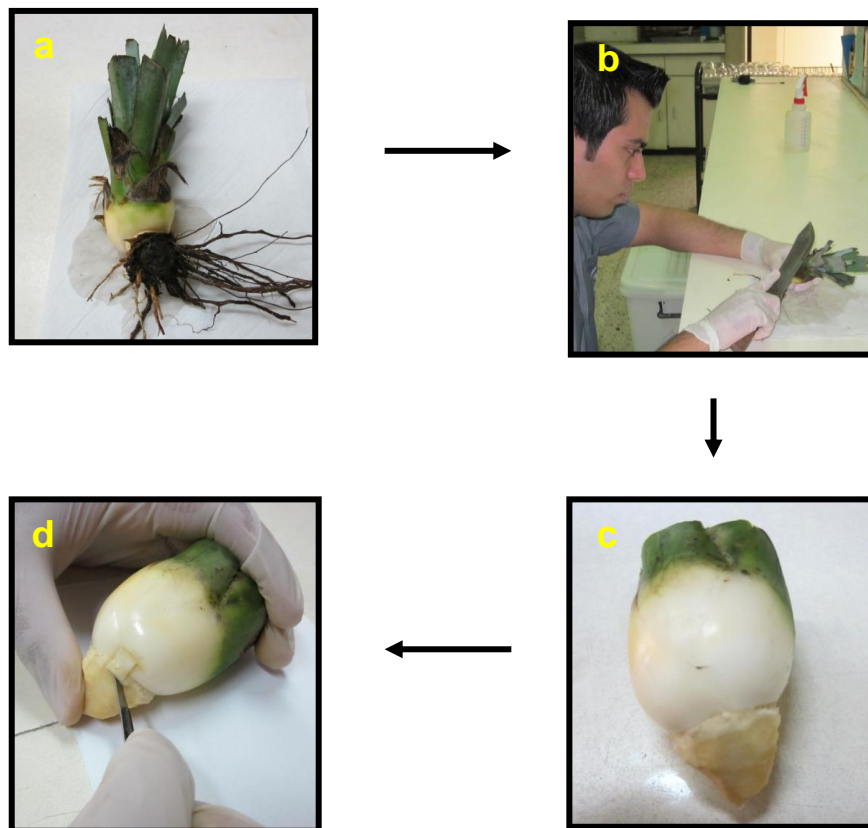


Figura 9. Procedimiento de preparación del material vegetativo de *Agave letonae* para su establecimiento *In Vitro*. a) Planta completa de *Agave letonae*. b) Eliminación de hojas y raíces. c) Cuerpo central de la planta. e) Extracción de yema axilar, CENTA 2012.

3.3.3. Esterilización superficial de explantes.

El material de campo presenta altos índices de contaminación, por ello se procedió a lavar cuidadosamente cada una de las yemas axilares con una esponja humedecida con agua y jabón con el fin de eliminar todo residuo de tierra, esto se realizó antes de evaluar los tratamientos siguientes:

Cuadro 2. Tratamientos de esterilización superficial de yemas axilares de *Agave letonae*, CENTA 2012.

Tratamiento/ desinfectante	Detergente comercial	Etanol 70%	hipoclorito de sodio	Agua deionizada esterilizada
T1	15 minutos	1 minuto	5 mg/l por tres minutos	Tres enjuagues con agitación continua, durante cuatro minutos cada tratamiento.
T2	15 minutos	1 minuto	4 mg/l por tres minutos	
T3	15 minutos	1 minuto	2.5 mg/l por tres minutos	

3.3.3.1. Siembra *In Vitro*.

Se trabajó en una cámara de flujo laminar con todas las medidas de asepsia requeridas, después de la desinfección se colocó cada yema axilar en un recipiente con agua esterilizada para evitar su deshidratación¹. Se procedió a tomar una yema con una pinza y se colocó en una hoja de papel esterilizado para eliminar las partes dañadas del tejido por la desinfección hasta obtener un explante de aproximadamente 0.5 cm (Salazar *et al.* 2009).

¹ M.Sc. Yanira Elizabeth López Ventura. Catedrática de la Escuela de Biología de la Universidad de El Salvador, 2012.

Después cerca del mechero se procedió a destapar un tubo de ensayo de 25 x 150 mm que contenía 10 ml de medio basal Murashige y Skoog (1962), se introdujo la yema al tubo de ensayo, se tapó (con un tapón tipo magenta), se selló y se rotuló. Se colocaron gradillas con 135 tubos de ensayo en estantes, en el cuarto de crecimiento, se dejaron siete días en oscuridad cubiertos por una caja de cartón, posteriormente se trasladaron a luz fluorescente a 28 °C y un fotoperiodo de dieciséis horas luz y ocho de oscuridad, todo controlado por timer (Salazar *et al.* 2009).

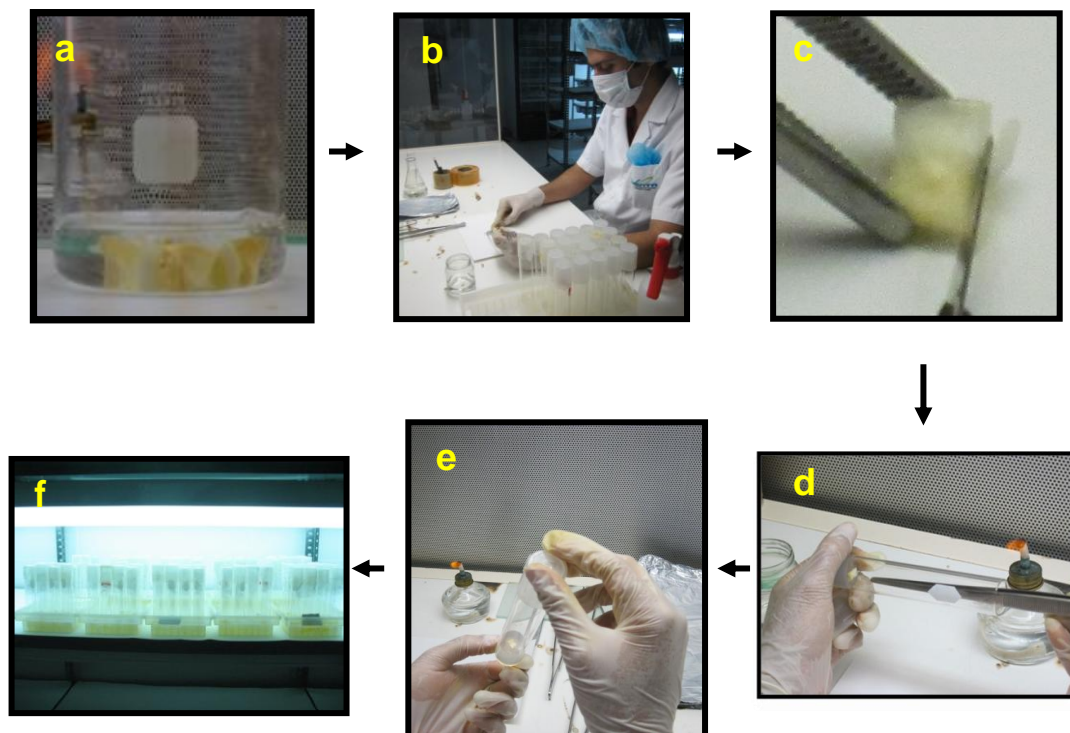


Figura 10. Procedimiento para el establecimiento *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*. a) Yemas de *Agave letonae* en agua estéril. b) y c) Eliminación de partes dañadas por la desinfección. d) Introducción de yema al tubo de ensayo. e) Rotulación de tubo de ensayo. f) Gradillas con tubos de ensayo en el cuarto de crecimiento, CENTA 2012.

3.3.3.2. Variables que se evaluaron.

1. Porcentaje de sobrevivencia (coloración verde e hinchamiento de yema)
2. Porcentaje de contaminación (por hongos o por bacterias).
3. Porcentaje de oxidación: necrosidad en el tejido.

Se hicieron observaciones durante catorce días. Para cada tratamiento se diseñó una hoja para la toma de datos (anexo 1).

3.3.3.3. Diseño experimental.

Se utilizó diseño completamente al azar en el cual 135 tubos de ensayo correspondientes a los tres tratamientos con sus tres repeticiones cada uno, se distribuyeron juntos, en forma aleatoria, etiquetados con su respectivo número de tratamiento y repetición, cada tratamiento constó de quince unidades experimentales, la unidad experimental fue una yema axilar por cada tubo de ensayo (Hurtado y Merino 1987).

Modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + r_i + E_{ij}$$

μ = media general de los efectos de cada tratamiento en cada una de las yemas.

r_i = Efecto del tratamiento con diferente concentración de lejía sobre el tejido.

E_{ij} = Error experimental.

3.3.3.4. Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza al 0.01%, a través del programa estadístico computacional de Microsoft EXCEL 2007.

3.3.4. Establecimiento *In Vitro*.

Una vez seleccionado el tratamiento de esterilización superficial más eficaz, se obtuvieron yemas de nuevas plantas de henequén, para su desinfección en detergente comercial, etanol al 70% e hipoclorito de sodio según el tratamiento seleccionado.

3.3.4.1. Preparación de medios de cultivo para el establecimiento *In Vitro*.

Para el establecimiento *In Vitro* se preparó medio de cultivo basal Murashige y Skoog (1962), suplementado con azúcar, vitaminas y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento: 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido indolbultírico (AIB) como se detalla en el siguiente cuadro:

Cuadro 3. Tratamientos para el establecimiento del cultivo *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, en medio de cultivo basal Murashige y Skoog (1962), con diferentes combinaciones de BAP y AIB, CENTA 2012.

Tratamientos	Reguladores del crecimiento	
	BAP mg/l	AIB mg/l
T1	0.5	0.5
T2	1.0	0.5
T3	0.5	1.0
T4	1.0	1.0
T5	0.0	0.0

➤ BAP= 6-bencilaminopurina; AIB= ácido indolbutírico.

Se midió el pH= 5.7, luego se agregó 8.0 g/l de agar (Salazar *et al.* 2009). Se llevó a ebullición el medio de cultivo utilizando un hotplate. Se dispensó en frascos de un litro y fueron esterilizados durante veinte minutos a 115 lb/pulg² de presión a 120°C (Esquivel y Escalant 1994). Después, en una cámara de flujo laminar se procedió a agregar 50 mg/l de Ridomil (Mefenoxam y Mancozeb) al medio de cultivo y al final se dispensó 10 ml en 150 tubos de ensayo.

3.3.4.2. Siembra *In Vitro*.

Al finalizar el proceso de desinfección, el explante fue trasladado a la cámara de flujo laminar, donde se procedió a eliminar las partes del tejido que fueron dañadas en el proceso anterior; se obtuvo una porción de aproximadamente 0.5 cm, introduciéndose en un tubo de ensayo de 25 x 150 mm; posteriormente se trasladaron al cuarto de crecimiento, en ausencia de luz durante 7 días y después fueron colocados en el estante con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, a 28°C.

3.3.4.3. Variables que se evaluaron.

1. Porcentaje de sobrevivencia (coloración verde e hinchamiento de yema)
2. Porcentaje de oxidación: necrosidad en el tejido.
3. Porcentaje de contaminación por hongos o por bacterias.
4. Porcentaje de vitrificación: tejido vítreo o quebradizo.
5. Porcentaje de brotación (brote: explante con dos hojas formadas).
6. Días a brotación

Se tomaron datos durante 56 días, los explantes fueron trasladados a medios de cultivo fresco cada veintidós días. Para cada tratamiento se diseñó una hoja para la toma de datos (anexo 2).

3.3.4.4. Diseño estadístico.

Se utilizó diseño completamente al azar, en el cual 150 tubos de ensayo correspondientes a los cinco tratamientos con sus tres repeticiones cada uno, se distribuyeron juntos, en forma aleatoria, etiquetados con su respectivo número de tratamiento y repetición. Cada tratamiento constó de diez unidades experimentales, la unidad experimental fue una yema axilar por cada tubo de ensayo (Hurtado y Merino 1987).

Modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + r_i + E_{ij}$$

μ = media general de los efectos de cada tratamiento en cada una de las yemas.

r_i = Efecto del tratamiento con auxinas y citoquininas.

E_{ij} = Error experimental.

3.3.4.5. Análisis estadístico.

Todos los datos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza al 0.01%, a través del programa estadístico computacional de Microsoft EXCEL 2007. Cuando se encontró diferencia estadística altamente significativa entre tratamientos se procedió a efectuar prueba de diferencia mínima significativa al 0.01%².

² Ing. Mario Antonio Bermúdez Márquez, Catedrático de Ingeniería Agronómica de la Universidad de El Salvador.

4. RESULTADOS.

4.1. Esterilización superficial de yemas axilares de *Agave letonae*.

Se evaluaron tres métodos de esterilización superficial de yemas axilares de *Agave letonae*. El análisis de varianza al 0.01% no detectó diferencia estadística altamente significativa entre tratamientos de esterilización superficial de yemas axilares.

4.1.1. Porcentaje de sobrevivencia.

La sobrevivencia de yemas axilares de *Agave letonae* fue notable a partir de los siete días de su siembra *In Vitro*, presentando una coloración verde clara en el explante, y en algunos casos también en el extra tejido, libre de microorganismos contaminantes y oxidación (Figura 11).

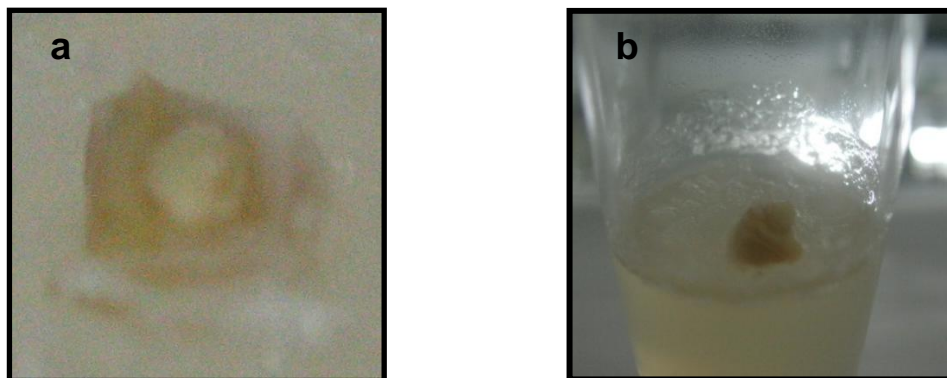


Figura 11. a) y b) Sobrevivencia de yemas axilares de *Agave letonae*, siete días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.

El tratamiento T2 (etanol 70% por un minuto y 4.0 mg/l de hipoclorito de sodio durante tres minutos) fue el tratamiento que presentó el mayor porcentaje promedio de sobrevivencia, 82.21% (Figura 14).

4.1.2. Porcentaje de oxidación.

La oxidación de yemas axilares se observó a partir de los siete hasta los catorce días de su siembra *In Vitro*, presentando una coloración café claro en algunas yemas y en otras negro (Figura 12).

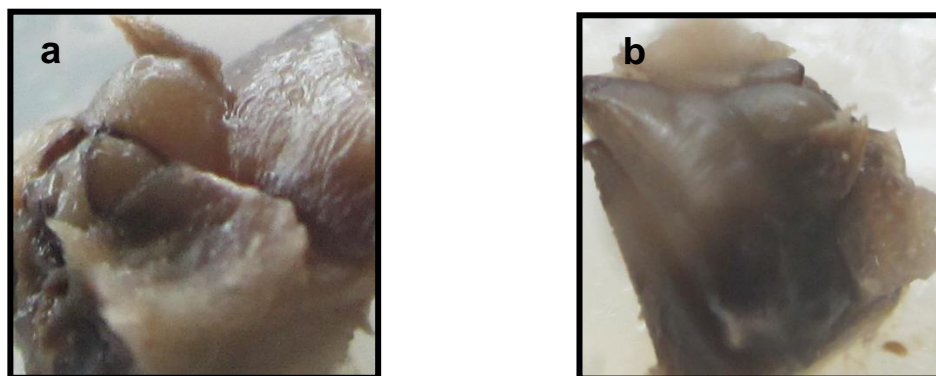


Figura 12. a) y b) Oxidación de yemas axilares de *Agave letonae*, catorce días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.

El tratamiento T1 (etanol 70% por un minuto y 5.0 mg/l de hipoclorito de sodio durante tres minutos), presentó mayor porcentaje de oxidación, 24.44 % y el tratamiento T2 (etanol 70% por un minuto y 4.0 mg/l de hipoclorito de sodio durante tres minutos), fue donde se obtuvo menor porcentaje, con un 6.67% (Figura 14).

4.1.3. Porcentaje de contaminación.

La contaminación de explantes por microorganismos se determinó a los siete días después de su introducción en los tres tratamientos y sus respectivas repeticiones. La presencia de bacterias fue mayor que de hongos, las bacterias formaron una capa blanca alrededor del explante y el micelio por hongos fue de coloración rojiza en todo el explante y en el medio de cultivo (Figura 13).

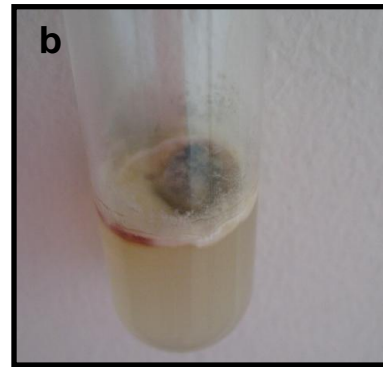
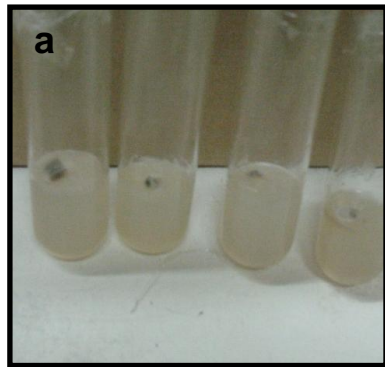


Figura 13. a) Contaminación por bacterias en yemas axilares de *Agave letonae*, siete días después de establecido el cultivo *In Vitro*. b) Contaminación por hongo en yema axilar de *Agave letonae*, siete días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.

El tratamiento T3 (etanol 70% por un minuto y 2.5 mg/l de hipoclorito de sodio durante tres minutos), presentó mayor porcentaje de contaminación con un 17.79%, y el tratamiento T1 (etanol 70% por un minuto y 5.0 mg/l de hipoclorito de sodio durante tres minutos), fue el que presentó menor porcentaje de contaminación, siendo de 6.68% (Figura 14).

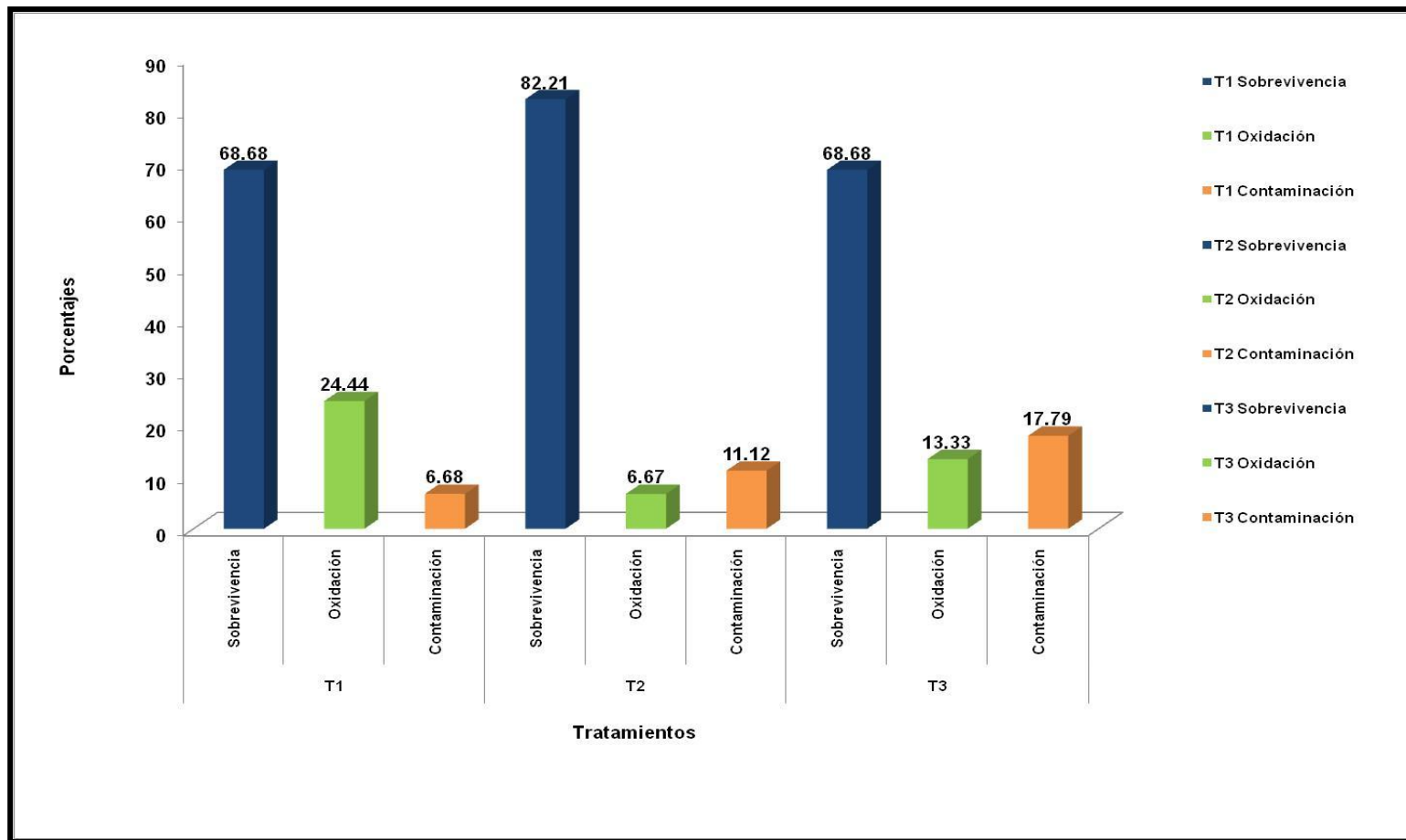


Figura 14. Porcentajes promedios de sobrevivencia, oxidación y contaminación *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, 56 días después de su siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.

4.2. Establecimiento *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*.

Los objetivos de esta fase fueron evaluar el efecto fisiológico en las yemas axilares de *Agave letonae*, de cinco tratamientos con medio Murashige y Skoog (1962), suplementados con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, 6-bencilaminopurina (BAP) y ácido indolbutírico (AIB) y seleccionar el tratamiento adecuado para inducir su brotación.

4.2.1. Porcentaje de sobrevivencia.

La sobrevivencia de yemas axilares de *Agave letonae* al establecimiento fue notable a partir de los siete hasta los cincuenta y seis días de su siembra, presentando inicialmente una coloración blanca que después de siete días presentaron hinchamiento o brotación con color verde claro a oscuro (Figura 15).

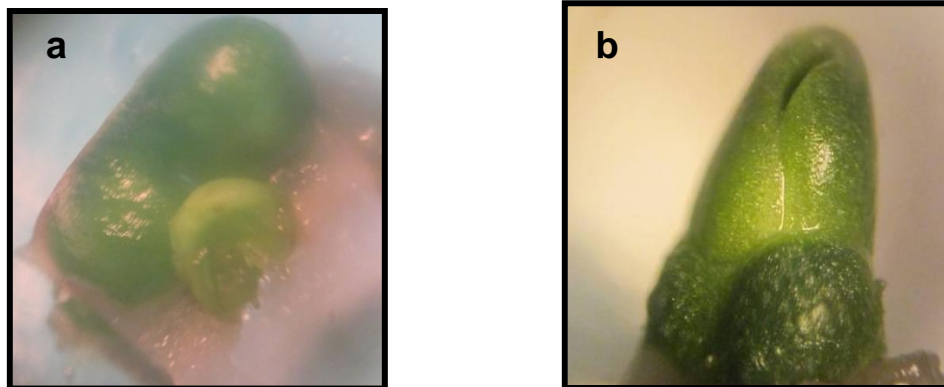
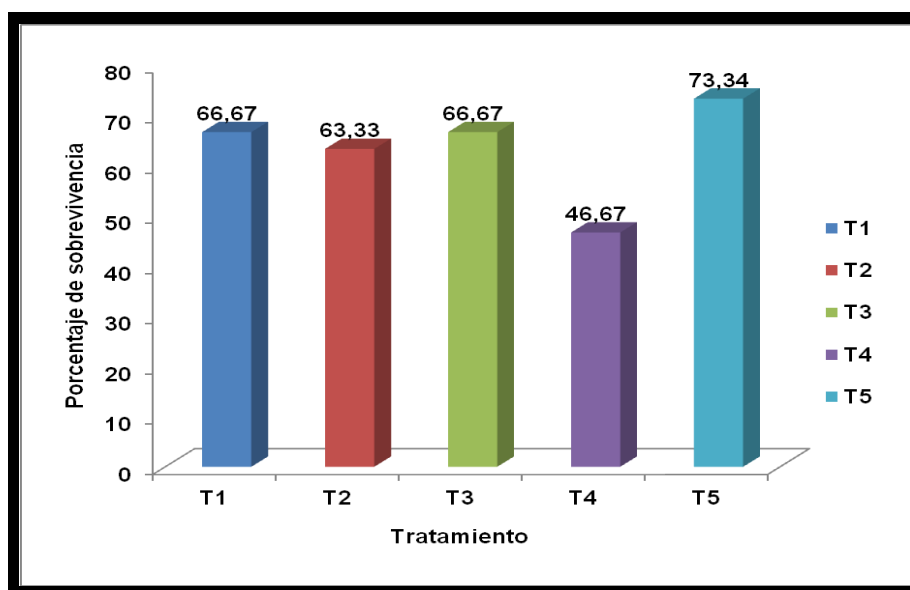


Figura 15. a) Sobrevivencia de yema axilar de *Agave letonae*, 21 días después de establecido el cultivo *In Vitro*. b) Sobrevivencia de yema axilar de *Agave letonae*, 35 días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.



- T= tratamiento; T1= BAP 0.5 mg/l - AIB 0.5 mg/l; T2= BAP 1.0 mg/l - AIB 0.5 mg/l; T3= BAP 0.5 mg/l - AIB 1.0 mg/l; T4= BAP 1.0 mg/l - AIB 1.0 mg/l; T5= BAP 0.0 mg/l - AIB 0.0 mg/l.

Figura 16. Porcentajes promedios de sobrevivencia *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, 56 días después de su siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.

4.2.2. Porcentaje de contaminación.

La contaminación por microorganismos en el establecimiento fue solamente por bacterias, atribuido a movimientos no adecuados dentro de la cámara de flujo laminar, siendo un porcentaje mínimo.

4.2.3. Porcentaje de oxidación.

La oxidación de yemas axilares se observó a partir de los siete hasta los cincuenta y seis días de su siembra, presentando una coloración café claro o negro en las yemas que se oxidaron en los primeros catorce días y en otras se observó yemas hinchadas con coloración verde oscura pero con manchas negras, indicando inicio de oxidación (Figura 17)

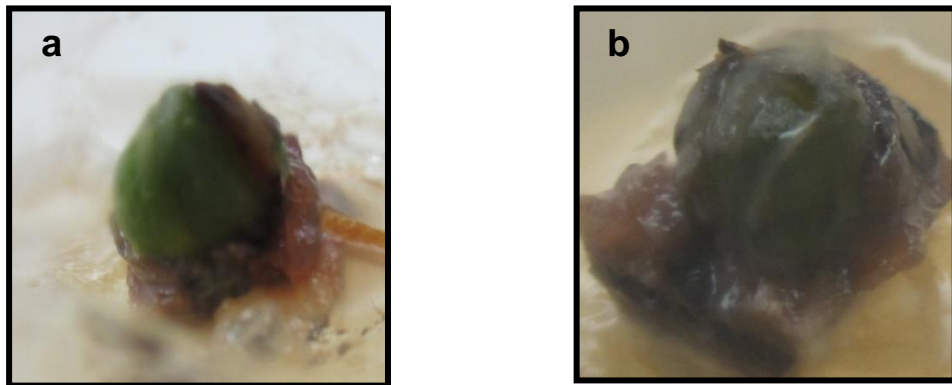
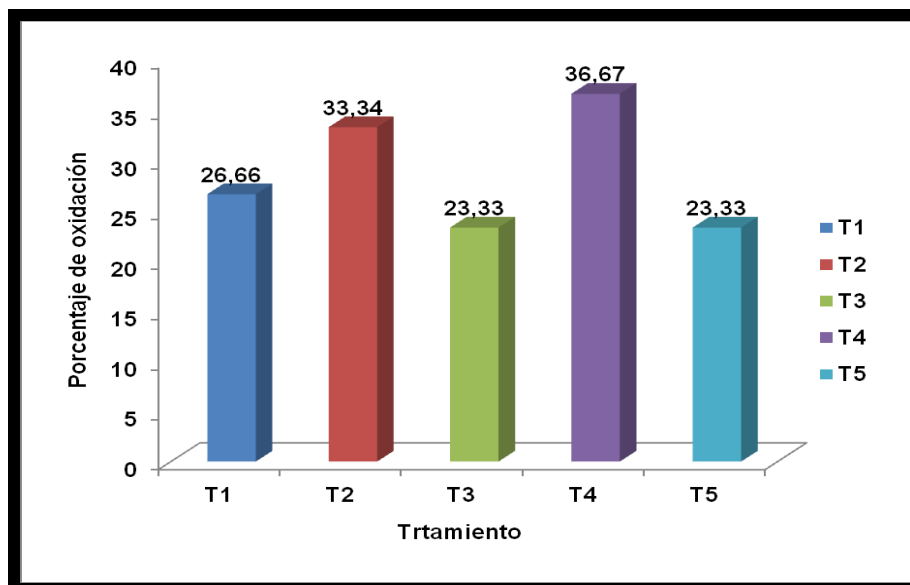


Figura 17. a) Oxidación de yema axilar de *Agave letonae*, 49 días después de establecido el cultivo *In Vitro*. b) Oxidación de yema axilar de *Agave letonae*, 56 días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.

Los tratamientos que presentaron menor porcentaje de oxidación fueron, T3 (MS basal + 0.5 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de AIB); T5 (MS basal + 0.0 mg/l de BAP y 0.0 mg/l de AIB), siendo de un 23.33% (Figura 18).



- T= tratamiento; T1= BAP 0.5 mg/l - AIB 0.5 mg/l; T2= BAP 1.0 mg/l - AIB 0.5 mg/l; T3= BAP 0.5 mg/l - AIB 1.0 mg/l; T4= BAP 1.0 mg/l - AIB 1.0 mg/l; T5= BAP 0.0 mg/l - AIB 0.0 mg/l.

Figura 18. Porcentajes promedios de oxidación *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, 56 días después de su siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.

4.2.4. Porcentaje de vitrificación.

La vitrificación de yemas axilares se observó a partir de los 35 hasta los 49 días de su siembra. Presentaron una coloración verde oscura muy intensa en la yema y en el tejido, con características externas quebradizas con consistencia blanda al tocarla (Figura 19). El único tratamiento que presentó este fenómeno fue el T4 (MS basal + 1.0 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de AIB), mostrando un porcentaje promedio de 13.33%.

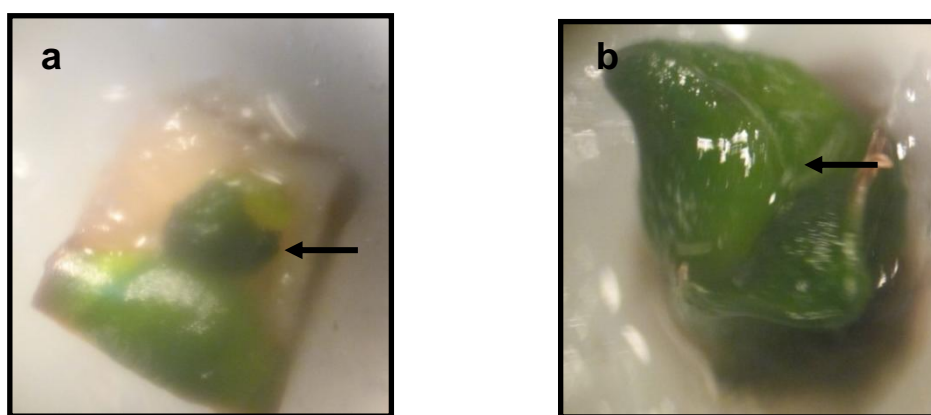


Figura 19. a) Vitrificación de yema axilar de *Agave letonae*, 35 días después de su establecimiento al cultivo *In Vitro*. b) Brote de *Agave letonae* vitrificado visto a través de estereoscopio, 49 días después de su establecimiento al cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.

4.2.5. Porcentaje de brotación.

La brotación de las yemas axilares se inició con la apertura de brácteas y aparición de los primordios foliares hasta la formación de dos hojas completas, presentando una coloración verde clara (primordios foliares) a oscura (hojas formadas).

El análisis de varianza al 0.01%, detectó diferencia estadística altamente significativa entre tratamientos (cuadro 4), y se procedió a realizar una prueba de diferencia mínima significativa al 0.01% de los cinco tratamientos con interacción de reguladores de crecimiento BAP y AIB (cuadro 5), indicando que el tratamiento más adecuado para inducir la brotación de yemas axilares de henequén, fue el T2 (MS basal + 1.0 mg/l de

BAP y 0.5 mg/l de AIB), con un porcentaje promedio de brotación de 40% (Figura 20).

Cuadro 4. Análisis de varianza para porcentaje de brotación *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, 56 días después de la siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.

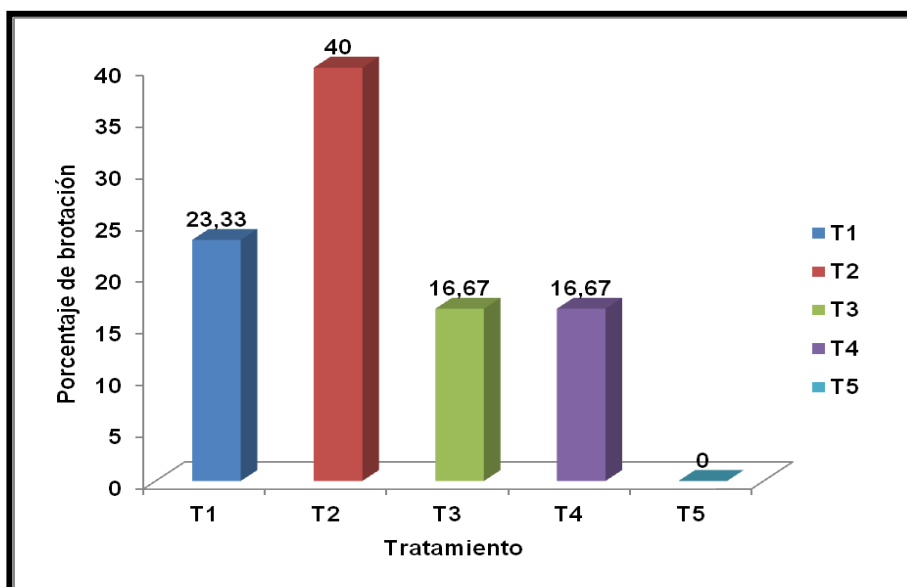
Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabla 0.01
Tratamientos	4	2,493.33	623.33	15.58**	3.16
Error	10	400.00	40.0		
TOTAL	14	2,893.33			

- **= Existe diferencia estadística altamente significativa entre tratamientos.
- CV= 25.99%.

Cuadro 5. Prueba de diferencia mínima significativa para porcentaje de brotación *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, 56 días después de la siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.

Tratamientos	Media	Calificación 0.01
T2= BAP 1.0 mg/l – AIB 0.5 mg/l	45.0	A
T1= BAP 0.5 mg/l – AIB 0.5 mg/l	28.33	B
T3= BAP 0.5 mg/l – AIB 1.0 mg/l	21.67	B
T4= BAP 1.0 mg/l – AIB 1.0 mg/l	21.67	B
T5= BAP 0.0 mg/l – AIB 0.0 mg/l	5.0	C

- Medias de los tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.



- T= tratamiento; T1= BAP 0.5 mg/l - AIB 0.5 mg/l; T2= BAP 1.0 mg/l - AIB 0.5 mg/l; T3= BAP 0.5 mg/l - AIB 1.0 mg/l; T4= BAP 1.0 mg/l - AIB 1.0 mg/l; T5= BAP 0.0 mg/l - AIB 0.0 mg/l.

Figura 20. Porcentajes promedios de brotación *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, 56 días después de la siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.

4.2.6. Días a brotación.

El análisis de varianza al 0.01%, detectó diferencia estadística altamente significativa entre tratamientos (cuadro 6), se procedió a realizar una prueba de diferencia mínima significativa al 0.01%, de los cinco tratamientos con interacción de reguladores de crecimiento BAP y AIB, indicando que el tratamiento más adecuado para acelerar la brotación de yemas axilares de henequén, con un promedio de 32 días de brotación (Figura 21), fue el T2 (MS basal + 1.0 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIB) (cuadro 7).

Cuadro 6. Análisis de varianza para días a brotación *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, 56 días después de la siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.

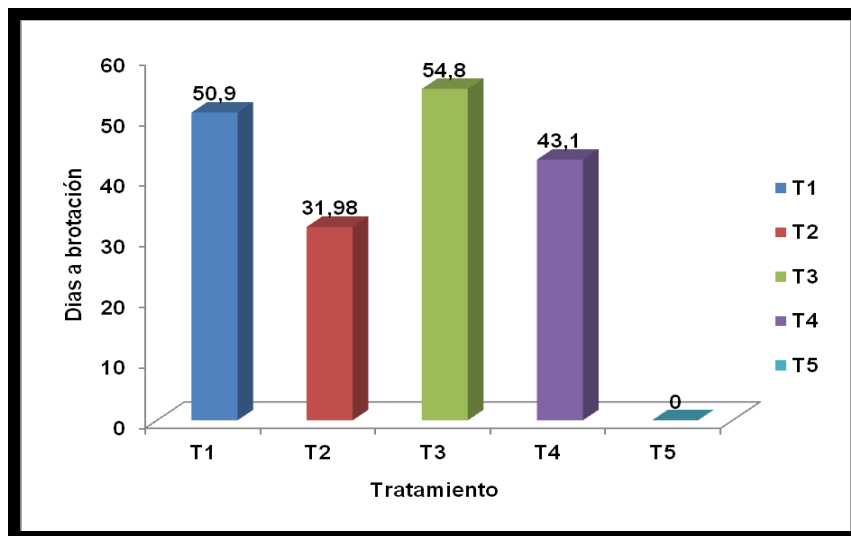
Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabla 0.01
Tratamientos	4	0.34	0.08641	22.04**	3.16
Error	10	0.03	0.00392		
TOTAL	14	0.38			

- **= Existe diferencia estadística altamente significativa entre tratamientos.
- CV= 11.22%

Cuadro 7. Prueba de diferencia mínima significativa para días a brotación *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, 56 días después de la siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.

Tratamientos	Media	Calificación 0.01
T2= BAP 1.0 mg/l – AIB 0.5 mg/l	0.76	A
T1= BAP 0.5 mg/l – AIB 0.5 mg/l	0.63	AB
T3= BAP 0.5 mg/l – AIB 1.0 mg/l	0.55	B
T4= BAP 1.0 mg/l – AIB 1.0 mg/l	0.55	B
T5= BAP 0.0 mg/l – AIB 0.0 mg/l	0.3	C

- Medias de los tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.



- T= tratamiento; T1= BAP 0.5 mg/l - AIB 0.5 mg/l; T2= BAP 1.0 mg/l - AIB 0.5 mg/l; T3= BAP 0.5 mg/l - AIB 1.0 mg/l; T4= BAP 1.0 mg/l - AIB 1.0 mg/l; T5= BAP 0.0 mg/l - AIB 0.0 mg/l.

Figura 21. Días promedio a brotación *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, 56 días después de la siembra en medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, CENTA 2012.

4.3. PROTOCOLO PARA EL ESTABLECIMIENTO *In Vitro* DE *Agave letonae* (HENEQUÉN) A PARTIR DE YEMAS AXILARES (CENTAUES, 2012).

Después de realizar los análisis de los experimentos desarrollados en la fase de esterilización superficial y de establecimiento *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, se propone el siguiente protocolo:

a) Esterilización superficial de yemas axilares de *Agave letonae*.

1. Eliminar las hojas y raíces, dejando solo el cuerpo central de la planta con las yemas axilares expuestas.
2. Aislar las yemas axilares con una pequeña porción de tejido, aproximadamente 0.8-1.0 cm y colocarlas en un recipiente con agua para evitar su deshidratación.
3. Lavar cuidadosamente cada una de las yemas axilares con una esponja humedecida con agua y jabón con el fin de eliminar todo residuo de tierra.

Dentro de cámara de flujo laminar:

4. Dejar las yemas axilares en un recipiente con agua y detergente durante quince minutos, con agitación continua.
5. Realizar tres enjuagues con agua estéril (cuatro minutos cada enjuague).
6. Esterilizar con Etanol 70% durante un minuto.
7. Dejar en un recipiente con 4mg/l de hipoclorito de sodio durante tres minutos, con agitación continúa.
8. Realizar tres enjuagues con agua estéril (cuatro minutos cada enjuague).

9. Dejar las yemas axilares en un recipiente con agua estéril para evitar su deshidratación.

b) Siembra *In Vitro*:

1. Tomar una yema con la pinza y colocarla en una hoja de papel esterilizado para eliminar las partes dañadas del tejido por la desinfección hasta obtener un explante de aproximadamente 0.5 cm.
2. Introducir la yema axilar a un tubo de ensayo que contenga medio de cultivo basal Murashige y Skoog (1962) suplementado con 1.0 mg/l de BAP + 0.5 mg/l de AIB.
3. Tapar y sellar el tubo de ensayo, colocarlo en gradilla, en un estante en el cuarto de crecimiento.
4. Dejar la gradilla con los tubos de ensayo siete días en la oscuridad cubiertos con una caja de cartón.
5. Trasladar bajo luz fluorescente a un fotoperiodo de dieciséis horas luz y ocho de oscuridad a 28° C.

5. DISCUSION

5.1. Esterilización superficial de explantes.

La esterilización superficial de yemas axilares de *Agave letonae* se logró con los tres tratamientos evaluados, los cuales fueron estadísticamente iguales en cuanto a sobrevivencia, contaminación y oxidación, por lo que se aceptó la hipótesis nula, de que en todos los tratamientos de esterilización superficial, la presencia de microorganismos contaminantes sería baja y se obtendría mayor porcentaje de sobrevivencia.

El mayor porcentaje promedio de sobrevivencia fue de 82.21%, obtenido con el tratamiento T2 (etanol 70% por un minuto y 4 mg/l de hipoclorito de sodio durante tres minutos). El empleo de hipoclorito de sodio a una alta concentración en un período corto provocó menor daño a los tejidos de los explantes, reduciendo la aparición de microorganismos contaminantes; por lo que concentraciones bajas de hipoclorito de sodio y con el mismo período pudiesen tener un efecto favorable para la proliferación de microorganismos contaminantes. Resultados diferentes obtuvieron Salazar *et al.* 2009, al obtener un 100% de sobrevivencia de yemas axilares del escapo floral, al desinfectarlas con alcohol un minuto e hipoclorito de sodio 2.5% durante cinco minutos; también García *et al.* 2007, obtuvieron un 93.7% de yemas axilares de *Bambusa vulgaris var Vittata* libres de contaminantes microbianos visibles, utilizando hipoclorito de sodio al 2.0% durante veinte minutos, y Berríos *et al.* 1996, obtuvieron 70% de sobrevivencia de las yemas de corona de Piña *Ananas comosus* L. Merr variedad "hawaiana" al desinfectarlas en alcohol un minuto y cloro comercial al 15% durante diez minutos.

Los autores antes mencionados obtuvieron resultados positivos de sobrevivencia de yemas axilares, libres de microorganismos contaminantes y oxidación, utilizando hipoclorito de sodio a concentraciones bajas en comparación a las utilizadas en la presente investigación, esto

probablemente se deba a que las yemas axilares que ellos utilizaron no se encuentran en contacto con el suelo, a diferencia de las yemas del tallo de la planta de henequén que se encuentran en contacto directo con el suelo, además de que provenían del campo de cultivo, lo que favorece mayor presencia de microorganismos como hongos y bacterias, así como mencionan Ramírez y Salazar 1997, cuando la planta donante crece directamente en el campo, está expuesta a plagas, enfermedades, polvo y otros agentes, sin ningún tipo de control ambiental. Factores que hacen que se dificulte la desinfección superficial para el establecimiento *In Vitro* y se utilicen concentraciones altas de hipoclorito de sodio. Así como mencionan Castillo y Smith 1997 citado por García *et al* 2007, resulta importante determinar la concentración de hipoclorito de sodio que garantice el control de los microorganismos contaminantes y la supervivencia de los tejidos del explante.

Debido a la procedencia del material donante y para prevenir la aparición de microorganismos contaminantes se agregó 50 mg/l de Ridomil (Mefenoxam y Mancozeb) al medio de cultivo, según Roca y Mroginski 1991, los tejidos pueden llevar contaminadores en su superficie, en su interior, o en ambas partes, lo que hace necesario la inclusión de fungistáticos o bacteriostáticos en el medio de cultivo, lo que probablemente influyó en los resultados obtenidos, debido que el porcentaje de aparición de hongos fue menor en comparación con la aparición de bacterias.

Según Butcher e Ingram 1976; Debergh y Maene 1984 citado por Oviedo y Guevara 1988, la presencia de contaminantes, aunque de lento crecimiento, no es conveniente, ya que pueden llegar a producir toxinas o estimulantes que lleguen a afectar el crecimiento normal o producir mutaciones.

Para la prevención del problema de oxidación, las yemas axilares se dejaron en la oscuridad por siete días, así como recomiendan Salazar *et al.* 2009 en cultivo *In Vitro* de yemas axilares de *Agave cocui*; y Fernández *et al.*

1997, en multiplicación *In Vitro* de piña, dejar los explantes recién disectados con baja luminosidad o en oscuridad durante los primeros días de cultivo, porque la luz estimula la oxidación de compuestos orgánicos en las células durante las etapas iniciales del cultivo de tejidos meristemáticos, como es el cultivo de yemas, lo que pudo haber influido en los porcentajes obtenidos de oxidación.

5.2. Establecimiento *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*.

Una vez seleccionado el mejor tratamiento de esterilización superficial de yemas axilares de henequén, se procedió a realizar la desinfección de nuevas yemas axilares para su establecimiento, donde se sembraron trece ó catorce yemas por repetición en cada uno de los cinco tratamientos, de las cuales se seleccionaron diez que estuvieran libres de contaminación y oxidación, para tener igual número de unidades experimentales por tratamiento.

La iniciación del crecimiento implica el rompimiento de la latencia de las yemas axilares, hecho que se favorece con la presencia de sustancias inductoras como las auxinas y las citoquininas (Rodríguez *et al.* 1999).

Se detectó diferencia estadística altamente significativa entre tratamientos, por lo que se rechazó la hipótesis nula y se aceptó la hipótesis alternativa, donde al aumentar la concentración de 6-bencilaminopurina (BAP) y se disminuyera la concentración de ácido indolbutírico (AIB), se aceleraría la brotación de las yemas axilares de *Agave letonae*. El tratamiento que proporcionó los mejores resultados en cuanto a rompimiento de dormancia en yemas axilares de *Agave letonae*, fue el T2 (MS basal + 1.0 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIB), con un 40% de brotación a los 32 días en promedio. Esto probablemente se debió a una mayor concentración de BAP con respecto a AIB. Así como mencionan Mejía y Vittorelli 1988; Suárez 1993, que la proporción alta de citoquinina en relación con la auxina, tiende a promover la formación y crecimiento de brotes. También Mejía y Vittorelli

1988; Roca y Mroginski 1991; Toro 2004, mencionan que las citoquininas inducen la organogénesis y estimulan el rompimiento de la latencia de yemas axilares. Estos resultados concuerdan con Villalobos *et al.* 1991, al utilizar las mismas concentraciones de reguladores de crecimiento, donde yemas axilares de *Agave atrovirens* sembradas en un medio de cultivo suplementado con 1.0 mg/l de Kinetina (citoquinina) y 0.5 mg/l de ácido indolacético (auxina), brotaron a las tres semanas de su siembra.

Resultados diferentes obtuvieron Salazar *et al.* 2009, en el cultivo *In Vitro* de yemas del escapo floral en *Agave cocui*, en un medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con una igualdad de concentración de reguladores de crecimiento, benciladenina (citoquinina) 1.0 mg/l y ácido naftalenacético (auxina) 1.0 mg/l, donde los brotes fueron evidentes 30 días posterior al cultivo; Berríos *et al.* 1996, en la etapa de iniciación, observaron rompimiento de dormancia en yemas de *Ananas comosus* L. Merr variedad "hawaiana" a los trece días en promedio, en un medio de cultivo suplementado con una menor concentración de citoquinina, 0.65 mg/l de ácido giberélico (giberelina) y 0.5 mg/l de 6-bencilaminopurina (citoquinina).

Con respecto a las yemas axilares que no alcanzaron la brotación pero que presentaron hinchamiento con ruptura de brácteas y coloración verde oscura, puede ser resultado de las condiciones fisiológicas que presentaban. Debido a la escases de plantas madres, no se realizó una selección de yemas adecuadamente que presentaran las condiciones requeridas para su establecimiento, incluyendo que no todos los explantes provenían de plantas con la misma edad y condición fisiológica, por consiguiente las yemas no eran homogéneas. Concordando con lo que mencionan Roca y Mroginski 1991, que la procedencia, tamaño y la edad fisiológica del explante, son aspectos que se deben de tener en cuenta para el establecimiento de los cultivos, por las respuestas variables que se pueden obtener y para poder aplicar la organogénesis de una manera exitosa.

El alto porcentaje de oxidación de yemas axilares que se obtuvo, posiblemente se deba en gran parte al seccionamiento realizado a los explantes en el momento de eliminar partes dañadas por la desinfección. Así como mencionan Gómez 2002; Afanador 2005, el ennegrecimiento de los tejidos se produce por la acción de enzimas oxidasas que son exudadas y sintetizadas por tejidos heridos.

Otra de las probables causas de la oxidación en las yemas axilares, fue la interacción de los reguladores de crecimiento. Como menciona George 1996 citado por Azofeifa 2009, la producción de polifenoles esta influenciada por los reguladores de crecimiento agregados al medio de cultivo, las auxinas y citoquininas son los grupos de reguladores del crecimiento mas relacionados con el problema de oscurecimiento de explantes.

Resultados similares obtuvieron Salazar *et al.* 2009, en establecimiento *In Vitro* de yemas axilares de *Agave cocui*, solo 40% de los explantes se mantuvieron verdes cuatro semanas posteriores a la siembra. Los explantes que no mantuvieron el color verde se necrosaron en las primeras dos semanas de cultivo *In Vitro*; también Brisson *et al.* 1998 citado por Azofeifa 2009, mencionan que en cultivo de *Chrysosplenium americanum* el oscurecimiento de brotes ocurrió cuando se utilizó BAP, el problema se evitó con el uso de Kinetina (KIN).

Se sabe también que la condición y la edad fisiológica de los explantes es fundamental para la respuesta que exhibirán *In Vitro*, por lo que pudo afectar la sobrevivencia de las yemas axilares para su establecimiento.

Para tratar de contrarrestar los efectos de oxidación presentes en yemas axilares, se realizaron trasplantes a medio de cultivo fresco cada siete días, pero no se tuvo éxito. El uso de subcultivos frecuentes para reducir problemas de oxidación, ya se ha utilizado en diferentes especies: *Rubus sp* (Broome y Zimmerman 1978), *Musa sp* (Banarjee y De Langhe 1985), con resultados positivos, citado por Azofeifa 2009.

El fenómeno de vitrificación en yemas axilares solo se hizo presente en el tratamiento T4 (MS basal + 1.0 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de AIB), con un promedio de 13.33%, posiblemente por la fisiología de las yemas y efecto de altas concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB. Así como mencionan Toro 2004; Gómez 2002, la responsabilidad de desórdenes fisiológicos como la vitrificación, puede atribuirse a la composición con altos niveles de reguladores de crecimiento y la consistencia del medio de cultivo.

Para evitar este tipo de fenómeno se procedió a utilizar un medio de cultivo solidificado con agar a una concentración de 8 g/l, según lo recomendado por Garriga *et al.* 2006 al obtener un mayor número de brotes vitrificados de *Agave fourcroydes Lem* en medio líquido y menor porcentaje de brotes vitrificados en medios solidificados con 8 y 10 g/l de agar. También los mismos autores mencionan el efecto que presenta la citoquinina BAP en altas concentraciones para la obtención de brotes vitrificados.

6. CONCLUSIONES.

- Los tres tratamientos de desinfección evaluados son útiles para realizar la esterilización superficial de yemas axilares de *Agave letonae*.
- Cuando se aumentó la concentración de 6-bencilaminopurina (BAP) y disminuyó la concentración de ácido indolbutírico (AIB), se aceleró la brotación de las yemas axilares de *Agave letonae*, en medio de cultivo MS basal.
- El medio de cultivo mas adecuado para inducir la brotación *In Vitro* de yemas axilares de *Agave letonae*, es el MS basal suplementado con 1.0 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIB.

7. RECOMENDACIONES.

- El material que será usado como donante de yemas axilares deberá estar libre de enfermedades y plagas, que posea apariencia sana y vigorosa; debe ser proveniente de invernaderos donde se realicen tratamientos fitosanitarios.

- Al momento de extraer las yemas axilares de la planta de henequén, se deben seleccionar las que estén bien diferenciadas, especialmente las de la parte media del tallo.

- Continuar con el proceso de micropropagación de *Agave letonae*, realizando las siguientes etapas: multiplicación *In Vitro*, enraizamiento *In Vitro*, aclimatación, viveros, hasta la siembra en los campos de cultivo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta M., Caballero I., Alvarado Y., y Leiva M. 2002. Micobiota epifítica y contaminantes fungosos del establecimiento *In Vitro* de la guayaba (*Psidium guajava* L) [versión electrónica]. Biotecnología vegetal Vol. 2, Nº 2: 67-71.
- Afanador A. 2005. Propagación *In Vitro* a partir de meristemas de cinco variedades comerciales de *Dianthus caryophyllus* L (clavel). Bogotá, Trabajo de grado (Titulo de Biología) Pontifica Universidad Javeriana, Facultad de ciencias, Carrera de Biología.
- Anaya J., Ochoa A., Martínez D. y Moreno S. s. a. Organogénesis indirecta de *Agave parviflora*, una especie en peligro y con alto potencial económico [versión electrónica]. VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. 124-134.
- Azofeifa A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *In Vitro*. [versión electrónica]. Agronomía mesoamericana Vol. 20 No 1: 153-175.
- Banerjee N. y De Langhe E. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of Musa. Plant Cell Reports 4:351-354.
- Berríos E., López Y. y Miranda A. 1996. Micropropagación de dos variedades de piña (*Ananas comosus* L. Merr) “hawaiana” y “azucarón”, utilizando las yemas de la corona. San Salvador, Trabajo de grado (licenciada en biología) Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Escuela de Biología.

- Berthoul M. y Berrios A. 1987. Tecnología del cultivo de tejidos de café. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. México. 23 páginas.
- Brisson L., Ibrahim R. and Rideau M. 1998. Tissue culture of *Chrysosplenium americanum* and its potencial for flavonoid production. *Plant Cell Reports* 7: 130-133
- Broome, O. y Zimmerman R. 1978. *In Vitro* propagation of blackberry. [versión electrónica]. *HortScience* 13: 151-153.
- Butcher D. y Ingram D. 1976. *Plant tissue culture*. Londres, Edward Arnold (Publishers). 66p.
- Campos, J. 1987 .Estudio agroeconómico de fibras burdas henequén y kenaf. Ministerio de Agricultura y Ganadería. El Salvador. 50 páginas.
- Castillo B. y Smith D. 1997. Interactions of irradiance level and iron chelate source during shoot tip culture of *Carica papaya* L. [versión electrónica]. *Hortscience* 32 (6): 1120-1123.
- Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA) 2008. Manual de medios de cultivo. Laboratorio de Biotecnología. El Salvador. 52 páginas.
- Contreras M., Martínez J. y Espinoza N. 1979. Proyecto cultivo del henequén. Ministerio de Agricultura y Ganadería. El Salvador. 77 páginas.
- Debergh P. y Maene L. 1984 Pathological and physiological problems related to the *In Vitro* cultura of plants. [versión electrónica]. *Parasitica* 40(2-3): 69-75.

Debergh, P. y Zimmerman 1991. *Micropropagation Technology and application*. Kluwer Academic Publishers. USA . 479 pag.

Domínguez M., González M., Gómez C., Valles C., Díaz S., Míreles S. y Pérez E. 2008. El cultivo *In Vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave* [versión electrónica]. *Investigación y ciencia* Número 41, 53-62.

Esquivel, A. y Escalant, J. 1994. *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. México. 38 páginas.

Fernández, I. 2002. Efecto de los reguladores de crecimiento en los procesos de organogénesis y embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana Mill*). Trabajo de grado (Doctorado en ciencias: área ciencias agrícolas y forestales), Universidad de Colima, México.

Fernández S., Marcano A. y Bravo M. 1997. *Cultivo de la piña Ananas comosus en Venezuela*, Centro de investigaciones agropecuarias del estado de Lara. IICA. Venezuela, 155 páginas.

García A. 2007. Los *Agaves* de México [versión electrónica]. *Ciencias No. 87. 14-23*.

García Y., Freige M., Fajardo L. Tejada. Y Reyes M. 2007, Establecimiento *In Vitro* de yemas axilares de *Bambusa vulgaris* var *Vittata* [versión electrónica]. *Biotecnología Vegetal* Vol. 7, No. 3: 155-159, julio septiembre, 2007.

Garriga M., Alemán S. y González G. 2006. Influencia del estado físico del medio de cultivo y diferentes combinaciones de reguladores del

crecimiento sobre la formación de brotes axilares en *Agave fourcroydes* Lem [versión electrónica]. *Biotecnología Vegetal* Vol. 6, No. 1: 3 – 7.

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 de micropropagación de henequén (*Agave fourcroydes* Lem) [versión electrónica]. *Chilean journal of agricultural research* 70(4): 545 - 551.

George, E. 1996. Plant propagation by tissue culture, part 2. In Practice. Exegetics Limited. England. 1361 pag.

Gómez A. 2002. Biotecnología aplicada a mejora de *pelargonium*. Madrid, Trabajo de grado (Doctor), Universidad complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Genética.

González. C, G. y Abreu C. E. 2009. El Henequén. Cultivo importante desconocido, con futuro promisorio. Obtenida 6 de junio de 2011, de <http://monografias.umcc.cu/monos/2009/AGRONOMIA/m09agr7.pdf>

González G., Alemán S., Trujillo R., Keb M., Abreu E., Barredo F., Ortiz R. y Cornides M. 2004. El cultivo *In Vitro* como alternativa de la recuperación henequenera (*Agave fourcroydes*) [versión electrónica]. *Biología Aplicada*; Vol.21, No.1 44-48.

Google Earth 2012. Ubicación Geográfica del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” del Departamento de la Libertad, El Salvador, C.A.

- Google Earth 2012. Ubicación Geográfica de los municipios de Comalapa y Concepción Quezaltepeque del Departamento de Chalatenango, El Salvador, C.A.
- Hurtado D. y Merino M. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. Primera edición. México. 232 páginas.
- León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura. Segunda edición. Costa Rica. 445 páginas.
- Litz R. y Jarret R. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. in Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. 144-157 pág.
- López A., García M., y Quintero R. 2002. Biotecnología alimentaria. Editorial Limusa. México. 636 páginas.
- Mejía R. y Vittorelli C. 1988. Cultivo *In Vitro* de plantas de papas. Instituto Nacional de Investigación Agrícola y Agroindustrial. 111 páginas.
- Moreno S. 1995. Propagación *In Vitro* de *Agave pacifica trel*, (Maguey de bacanora) para su conservación, repoblación y cultivo comercial. Sonora, Trabajo de grado (Maestro en ciencias). Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol plant*, 15: 473-479.

- Orellana P. 1998. Introducción a la micropropagación masiva. P. 151-178. En Ponce (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Santa Clara. IBP, 390 páginas.
- Otero, R. s. a. El cultivo del henequén (*Agave fourcroydes, Lem*) como planta textil y su aprovechamiento integral [versión electrónica]. Laboratorio BioFam, Cuba, 23-46.
- Oviedo Y. y Guevara E. 1988. Propagación *In Vitro* de la estatica *Limonium sinatum* CV. MIDNIGHT BLUE. [versión electrónica]. Agronomía Costarricense 12(1): 113-122.
- Paiz E. 2006. Organogénesis directa y embriogénesis indirecta en el cultivo de quequisque (*Xanthosoma spp.* L. Schott), cultivar Masaya. Managua, Universidad Nacional Agraria, Trabajo de grado (Trabajo de diploma) Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía, Departamento de Producción Vegetal.
- Quintanilla K. 2003. Micropropagación *In Vitro* de loroco (*Fernaldia pandurata* Woodson) a partir de meristemas apicales del brote. San Salvador, Trabajo de grado (Licenciada en biología). Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Escuela de Biología.
- Ramírez M. y Salazar E. 1997, Establecimiento *In Vitro* de segmentos nodales de guayabo (*Psidium guajava* L.) [versión electrónica]. Rev. Fac. Agrom. (LUZ). 1997, 14: 497-506.
- Reuther G, 1988. Comparative anatomical and physiological studies with ornamental plants under *In Vitro* and greenhouse conditions. Acta Horticulturae 226: 91-98.

- Reyes P. 1980. Diseño de experimentos aplicados. 344 paginas.
- Roca W. y Mroginski L. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. 969 páginas.
- Rodríguez F., Rodríguez J., Solano J., Castellanos J., y Peña G. 2008. Propagación *In Vitro* de maguey bruto (*Agave inaequidens koch*), una especie amenazada de interés económico [versión electrónica]. Revista chapingo serie horticultura 14 (3): 263-269.
- Rodríguez L., Santiago Y., Rosales Y., Igarza Y. y Fonet E. 1999. Cultivo *In Vitro* de *Ananas comosus* (L) Merr., (piña), cultivar cabezona, Coloquito internacional de biotecnología vegetal, libro de reportes cortos. Santa clara, Cuba. 56 paginas.
- Rojas S., García J. y Alarcón M. s. a. Propagación asexual de plantas. Cooperación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Colombia. 57 páginas.
- Romero, L. Y Escobar, R. 1999. Diccionario de Ciencias Hortícolas. Sociedad española de ciencias hortícolas. Mundi-Prensa Libros. España. 605 páginas.
- Rosell, C. y Villalobos, V. 1990. Fundamentos teóricos- prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Italia.112 páginas.
- Salazar E., Gonzales P. y Hernández C. 2009. Multiplicación *In Vitro* de *Agave cocui trelease* a través de yemas axilares [versión electrónica]. Agronomía Trop. V. 59 nº2.

- Sánchez R. 1991. Producción de oleaginosas y textiles. Editorial Limusa, S.A. de C.V. Tercera edición. México. 200 páginas.
- Suárez F. 1993. Agricultura, biotecnología y propiedad intelectual. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Costa Rica. 127 páginas.
- Toledo J., Espinoza N. y Golmirzaie A. 1998. Cultivo de tejidos manejo de plántulas *In Vitro* en la producción de semilla de papa. Centro internacional de la papa. Perú. 16 páginas.
- Toro M. 2004. Establecimiento de protocolos para regeneración *In Vitro* de cerezo dulce (*Prunus avium* L.) VAR. LAMBERT. Temuco, Trabajo de grado (Ingeniero Agrónomo). Universidad Católica de Temuco, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, Escuela de Agronomía.
- Trade Consulting 2010. Estudio sobre posibles medidas para reactivar al sector de las fibras burdas. CA. 26 páginas.
- Villalobos V., Mejía J. y Escobar H. 1991. Micropropagación de Opuntias y Agaves. in Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. 644-650 pág.
- Villalobos, V. y Thorpe T. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. in Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT. Colombia. 128-141 pág.

ANEXOS

Experimento _____
 Fecha _____

Semana N° ____
 Repetición N° ____

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ	X
T1												
T2												
T3												

Anexo 1. Hoja de toma de datos correspondiente a tratamientos de esterilización superficial de yemas axilares de *Agave letonae*, CENTA 2012.

Códigos: B: bacteria; H: hongo; O: oxidación; S: sobrevivencia.

Experimento _____
 Fecha _____

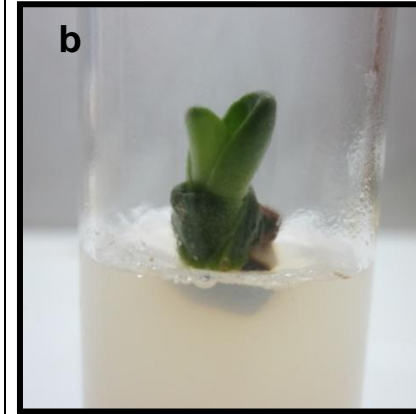
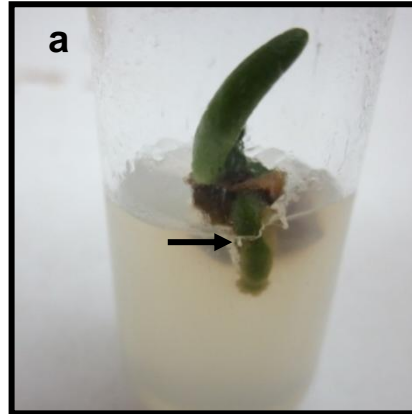
Semana N° ____
 Repetición N° ____

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Σ	X
1												
2												
3												
4												
5												

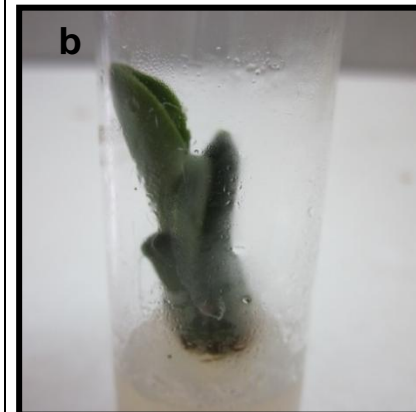
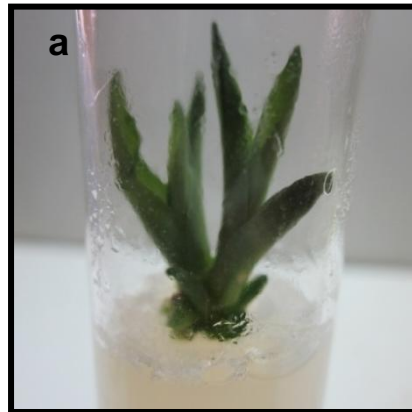
Anexo 2. Hoja de toma de datos correspondiente a tratamientos de interacción de reguladores de crecimiento BAP y AIB en medio de cultivo basal Murashige y Skoog (1962), CENTA 2012.

Códigos: H: hongo, B: bacteria; S: sobrevivencia; O: oxidación; V: vitrificación; Br: brotación.

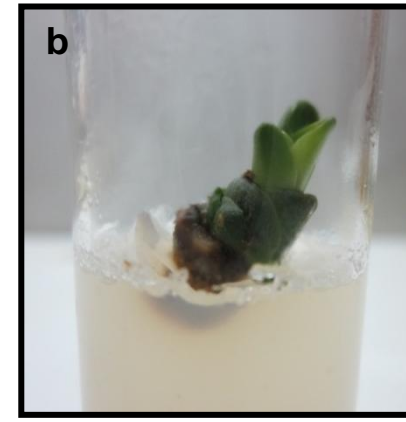
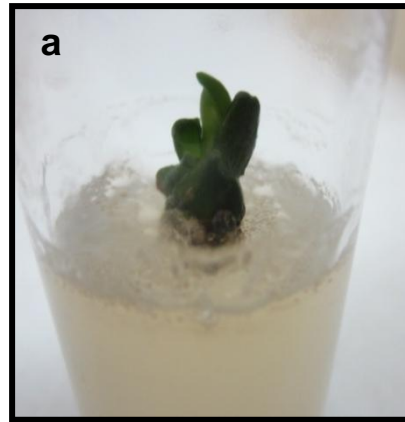
- a) Brote de *Agave letonae* con presencia de raíz, obtenido con 0.5 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIB, 56 días después de establecido el cultivo *In Vitro*; b) Brote de *Agave letonae*, obtenido con 0.5 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIB, 56 días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.



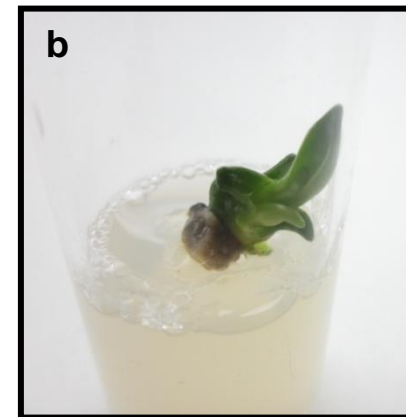
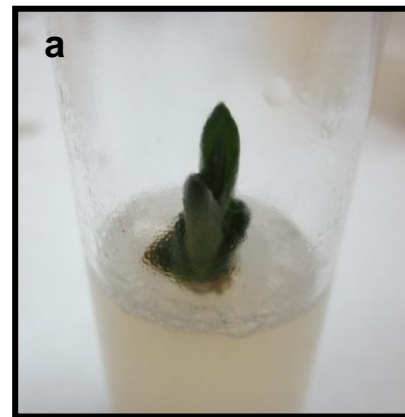
- a) y b) Brotes de *Agave letonae* obtenidos con 1.0 mg/l de BAP y 0.5 mg/l de AIB, 56 días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.



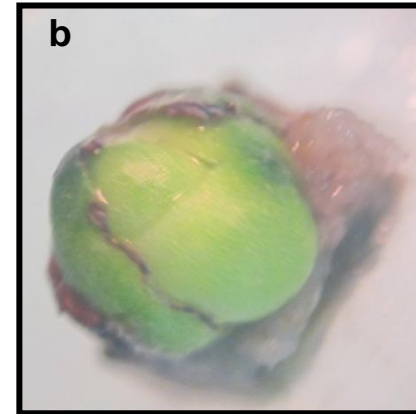
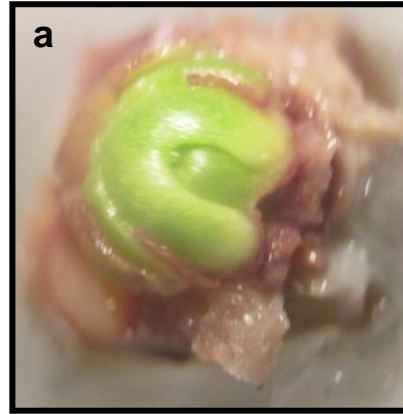
- a) y b) Brotes de *Agave letonae* obtenidos con 0.5 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de AIB, 56 días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.



- a) y b) Brotes de *Agave letonae* obtenidos con 1.0 mg/l de BAP y 1.0 mg/l de AIB, 56 días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.



a) y b) Yemas de *Agave letonae* vistas a través de estereoscopio, tratadas con 0.0 mg/l de BAP y 0.0 mg/l de AIB, 56 días después de establecido el cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.



Anexo 3. Yemas de *Agave letonae* tratadas con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento BAP y AIB, en establecimiento del cultivo *In Vitro*, CENTA 2012.

TABLA A2. Valores de "T" de Student

Grados de libertad	p = 0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0.02	0.01
1	0.158	0.325	0.510	0.727	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.706	31.821	63.657
2	0.142	0.289	0.445	0.617	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925
3	0.137	0.277	0.424	0.584	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841
4	0.134	0.277	0.414	0.569	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604
5	0.132	0.267	0.408	0.559	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032
6	0.131	0.265	0.404	0.553	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707
7	0.130	0.263	0.402	0.549	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499
8	0.130	0.262	0.399	0.546	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355
9	0.129	0.261	0.398	0.543	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250
10	0.129	0.260	0.397	0.542	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169
11	0.129	0.260	0.396	0.540	0.697	0.876	1.088	1.363	1.796	2.201	2.718	3.106
12	0.128	0.259	0.395	0.539	0.695	0.873	1.083	1.356	1.782	2.179	2.681	3.055
13	0.128	0.259	0.394	0.538	0.694	0.870	1.079	1.350	1.771	2.160	2.650	3.012
14	0.128	0.258	0.393	0.537	0.692	0.868	1.076	1.345	1.761	2.145	2.624	2.977
15	0.128	0.258	0.393	0.536	0.691	0.866	1.074	1.341	1.753	2.131	2.602	2.947
16	0.128	0.258	0.392	0.535	0.690	0.865	1.071	1.337	1.746	2.120	2.583	2.921
17	0.128	0.257	0.392	0.534	0.689	0.863	1.069	1.333	1.740	2.110	2.567	2.898
18	0.127	0.257	0.392	0.534	0.688	0.862	1.067	1.330	1.734	2.101	2.552	2.878
19	0.127	0.257	0.391	0.533	0.688	0.861	1.066	1.328	1.729	2.093	2.539	2.861
20	0.127	0.257	0.391	0.533	0.687	0.860	1.064	1.325	1.725	2.086	2.528	2.845
21	0.127	0.257	0.391	0.532	0.686	0.859	1.063	1.323	1.721	2.080	2.518	2.831
22	0.127	0.256	0.390	0.532	0.686	0.858	1.061	1.321	1.717	2.074	2.508	2.819
23	0.127	0.256	0.390	0.532	0.685	0.858	1.060	1.319	1.714	2.069	2.500	2.807
24	0.127	0.256	0.390	0.531	0.685	0.857	1.059	1.318	1.711	2.064	2.492	2.797
25	0.127	0.256	0.390	0.531	0.684	0.856	1.058	1.316	1.708	2.060	2.485	2.787
26	0.127	0.256	0.390	0.531	0.684	0.856	1.058	1.315	1.706	2.056	2.479	2.779
27	0.127	0.256	0.389	0.531	0.684	0.855	1.057	1.314	1.703	2.052	2.473	2.771
28	0.127	0.256	0.389	0.530	0.683	0.855	1.056	1.313	1.701	2.048	2.467	2.763
29	0.127	0.256	0.389	0.530	0.683	0.854	1.055	1.311	1.699	2.045	2.462	2.756
30	0.127	0.256	0.389	0.530	0.683	0.854	1.055	1.310	1.697	2.042	2.457	2.750
α	0.1256	0.2533	0.3853	0.5244	0.6744	0.8416	1.0364	1.2815	1.6448	1.9599	2.3263	2.5758

FUENTE: Diseño de Experimentos Aplicados de Pedro Reyes Castaneda. 1980.

Anexo 4. Valores de "T" de Student, (Reyes 1980).