



Instituto Nacional de
Ciencias Agrícolas
Departamento de *Genética y*
Mejoramiento



Universidad de
Matanzas
"Camilo Cienfuegos"
Facultad de Agronomía

**Aclimatización de plántulas de henequén
(*Agave fourcroydes* Lem.) y su evaluación en la
etapa de previvero**

**TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

Autor: Ing. Enildo Osmani Abreu Cruz

Habana
2009

Dedicatoria.

A mis queridos hijos, a mi esposa, a mis hermanos, a mis abuelos y padres, muy en especial a mi madre quien me inculcó tanto la necesidad del estudio y no pudo ver la conclusión de este trabajo, les dedico con todo el amor y cariño mi Tesis Doctoral.

Agradecimientos

Al finalizar el presente trabajo deseo agradecer a todas las personas que con su apoyo y colaboración hicieron posible la realización de esta tesis. Muy en especial a:

Mis tutores, **Dr. C. Rodobaldo Ortiz Pérez y Dr. C. Gerardo González Oramas**, quienes con sus conocimientos, guía, asesoramiento y constante dedicación hicieron posible la ejecución y culminación de este trabajo.

A todos mis compañeros del Centro de Estudios Biotecnológicos y de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos", por el estímulo y la colaboración brindada, Muy en especial a:

Jovana Pérez Ramos y Maryla Sosa del Castillo, por su constante ayuda y colaboración en la ejecución de todo el trabajo de investigación.

A los profesores **Michael Fernández LLamosa y el M. Sc. Miguel Garriga Caraballo** por toda su colaboración y ayuda brindada en la revisión y procesamiento de los resultados.

A la profesora **M. Sc. Silvia Alemán** por su asesoramiento y colaboración en la conducción de los ensayos de histología y en la discusión de los resultados.

A la profesora **M. Sc. Leticia Fuentes** por su apoyo y el tiempo dedicado en la revisión de este material.

Al profesor **M. Sc. Roberto Domech** por ofrecerme sus conocimientos y asesorarme en la discusión de los resultados.

Al profesor **Dr. C. Sergio Rodríguez** por su apoyo, constante estímulo y el tiempo dedicado en la revisión de este material.

A los profesores **Dr. C. Leonel Marrero y Dr. C. Ramón Liriano** por su constante apoyo y estímulo durante todo el período de tiempo dedicado a la ejecución de este trabajo.

A los profesores **Dr. C. Manuel Pérez y Yunel Pérez** por su preocupación y contar con sus criterios para una mejor calidad de este documento.

Al profesor **Dr. C. Reynaldo Villalonga** por su ayuda material e incondicional en la impresión de este documento.

Al **Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)**, por ser el centro guía y rector en la culminación de este trabajo y por ofrecerme oportunidades para profundizar en mis conocimientos y lograr una mayor calidad en mi formación profesional. Muy en especial a los profesores y trabajadores del departamento de Genética y Mejoramiento de plantas, quienes de una forma u otra me brindaron su apoyo y colaboración para poder lograr una mayor calidad en todo el trabajo de tesis.

Al profesor **Dr. C. Víctor Manuel Paneque** por ofrecerme sus conocimientos y su asesoramiento en el procesamiento de los resultados.

Al profesor **Dr. C. Pedro Rodríguez Hernández** por ofrecerme su ayuda y aportarme sus criterios en aras de darle mayor calidad a todo el trabajo de investigación y en el procesamiento de los resultados.

A la profesora **Dra. C. Ofelia Sam**, por toda la ayuda brindada en el trabajo de histología y por el tiempo dedicado al asesoramiento en la discusión de estos resultados.

A los profesores **Dr. C. Carlos de la Fe, Dr. C. Eduardo Jerez, Dr. C. Rodolfo Plana y Dr. C. Francisco Soto** por el tiempo dedicado en la revisión del documento tesis y aportar criterios para mejorar su calidad.

A los profesores **Dr. C. Mario Valera y Dr. C. Alberto Caballero** por su asesoramiento y ayuda en el procesamiento estadístico de los resultados.

Al profesor **Dr. C. Walfredo Torres** por el tiempo dedicado en la revisión de este material y aportar criterios que finalmente conllevaron a una mayor profundidad en la discusión de los resultados, organización y calidad de este documento.

Al **Dr. C. Romelio Rodríguez del Instituto de Bioplasmas de Ciego de Ávila** por ofrecerme sus conocimientos y criterios en la temática tratada.

Al **Dr. C. Juan Segura y demás colegas del Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, España**, que aunque en un corto tiempo me ofrecieron su apoyo y conocimientos para darle culminación a mi trabajo de tesis doctoral.

Al **Dr. C. Rodolphe Kanhonou Arthur**, esposa y familia por su apoyo incondicional durante mi estancia en la Universidad de Valencia, España.

Al profesor **Dr. C. Osmany Pérez Barral** por su constante preocupación y estímulo durante todo el trabajo de tesis doctoral.

A todas las personas que de una forma u otra han hecho posible la realización de este trabajo les doy las GRACIAS.

Símbolos y abreviaturas

ABA:	Acido abscísico
AIB:	Ácido indolbutírico
ANA:	Ácido naftalenacético
6 BAP:	6-Benzilaminopurina
CAM:	Metabolismo Ácido de las Crasuláceas
m.c.a.:	Metros columna de agua
PBZ:	Paclobutrazol
RUBISCO	Ribulosa bi fosfato carboxilasa/oxigenasa

SÍNTESIS

Se realizó un estudio del comportamiento de plántulas de henequén durante la fase de aclimatización y su evaluación en condiciones de previvero. Se ejecutaron diferentes experimentos con el objetivo de establecer el momento óptimo para concluir el proceso de aclimatización. En casa de cultivo se ejecutaron tres etapas de manera secuencial: Inicialmente se evaluó el efecto de la calidad de las plántulas en la supervivencia, posteriormente se estudió el efecto de diferentes niveles de materia orgánica (MO) en el sustrato en cuanto a supervivencia y crecimiento y finalmente se realizó una caracterización de las plántulas a partir de algunos indicadores anatomorfológicos y fisiológicos, variando las condiciones ambientales. Las plántulas con tamaños iguales o superiores a 7 cm, en un sustrato con 10 % de MO y 30 días de aclimatizada, que recibieron el siguiente manejo: de 0 a 15 días (HR \geq 90 % y FFF entre 558,74 y 686,55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y de 15 a 30 días, (80 % HR y FFF entre 1 303,37 y 1 602,04 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), lograron una supervivencia superior al 90 % y un patrón de crecimiento y desarrollo que permitió su traslado a previvero, a la vez que los indicadores fisiológicos evaluados presentaron comportamientos estables y favorables. En condiciones de previvero, se estudió el comportamiento de las plántulas con relación a sustrato y marco de plantación y se evaluó el efecto de diferentes fechas de plantación. El mayor crecimiento de las plántulas fue en condiciones de 100 % de sustrato orgánico con la pulpa de henequén descompuesta y marco de 10 x 10 cm. Las condiciones climáticas con temperatura media, superior a 24 °C favorecieron el crecimiento y desarrollo de las plántulas en esta fase. Con 30 días en condiciones de aclimatización se lograron los mejores beneficios económicos por conceptos de ahorro de recursos y fuerza de trabajo.

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. El género <i>Agave</i>	5
2.1.1. Ciclo de vida y reproducción.....	5
2.1.2. Origen y clasificación de las fibras vegetales.....	6
2.1.3. Importancia económica del género <i>Agave</i>	7
2.2. Origen, distribución y condiciones climáticas del henequén (<i>Agave fourcroydes</i> Lem.)	8
2.2.1. Propagación del henequén.....	9
2.2.1.1. Micropropagación del henequén.....	11
2.3. Características morfo-fisiológicas de las plántulas como consecuencia de las condiciones <i>in vitro</i>	12
2.3.1. Fotosíntesis en condiciones <i>in vitro</i>	14
2.4. Proceso de aclimatización de plántulas	16
2.4.1. Manejo de las plántulas.....	19
2.4.2. Sustrato.....	20
2.4.3. Manipulación de la luz en las casas de cultivo.....	23
2.4.4. Manejo de la humedad relativa.....	24
2.4.5. Control fitosanitario.....	26
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.0. Técnicas y procedimientos generales	27
a- Selección del material vegetal.....	27

b- Preparación del material vegetal.....	27
c- Condiciones generales del proceso de aclimatización.....	28
d- Condiciones generales del crecimiento en previvero.....	29
3.1. Efecto de la calidad de las plántulas en la supervivencia, en el momento de salida de las condiciones <i>in vitro</i> a las <i>ex vitro</i>.....	29
3.2. Establecimiento de un sustrato que favorezca el proceso de aclimatización de las plántulas de henequén.....	30
3.3. Estudio del comportamiento de plántulas de henequén bajo diferentes condiciones de sustrato y marco de plantación en la fase de previvero.....	32
3.4. Efecto del incremento del flujo de fotones fotosintéticos (FFF) y la reducción de la humedad relativa (HR) sobre la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización.....	34
3.5. Efecto del momento de traslado de las plántulas desde las condiciones de ambiente controlado (aclimatización) a ambiente natural (previvero).....	35
3.6. Estudio de algunos cambios anatomorfológicos y fisiológicos producidos en las plántulas durante la aclimatización.....	36
3.7. Estudio del comportamiento de plántulas de henequén en condiciones de previvero, en diferentes fechas de plantación.....	40
3. 8. Valoración económica.....	41
3.9. Análisis estadísticos.....	42
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.1. Efecto de la calidad de las plántulas en la supervivencia, en el	

momento de salida de las condiciones <i>in vitro</i> a las <i>ex vitro</i>	44
4.2. Establecimiento de un sustrato que favorezca el proceso de aclimatización de las plántulas de henequén.....	53
4.3. Estudio del comportamiento de plántulas de henequén bajo diferentes condiciones de sustrato y marco de plantación en la fase de previvero.....	58
4.4. Efecto del incremento del flujo de fotones fotosintéticos (FFF) y la reducción de la humedad relativa (HR) en la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización.....	61
4.5. Efecto del momento de traslado de las plántulas desde las condiciones de ambiente controlado (aclimatización) a ambiente natural (previvero).....	65
4.6. Estudio de algunos cambios anatomorfológicos y fisiológicos producidos en las plántulas durante la aclimatización.....	66
4.7. Estudio del comportamiento de plántulas de henequén en condiciones de previvero, en diferentes fechas de plantación.....	88
4.8. Valoración económica.....	92
4.9. Propuesta de manejo para la aclimatización de plántulas de henequén.....	95
V. CONCLUSIONES.....	98
VI. RECOMENDACIONES.....	100
REFERENCIAS.....	101
ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

La ampliación del mercado de la fibra natural y las tendencias actuales encaminadas a la conservación del medio ambiente, ofrecen nuevas oportunidades para algunos cultivos como el henequén (*Agave fourcroydes* Lem.), fuente de fibras naturales con diversos usos. Es además un cultivo altamente productivo en áreas ecológicamente limitadas por la escasez de agua y suelo (Colunga *et al.*, 1998) y con potencialidades para la producción de productos naturales como esteroides y detergentes a partir de sus sapogeninas (Robert *et al.*, 1992), celulosa a partir de su fibra (Keb *et al.*, 2002) y principios activos para la industria farmacéutica y la industria agropecuaria (Eastmond *et al.*, 2000).

En Cuba el cultivo del henequén se desarrolló favorablemente desde su introducción a mediados del siglo XIX, lo que conllevó a su industrialización y la comercialización de las fibras en el mercado internacional. Sin embargo, desde principios de la década de los 90 del siglo XX, ha experimentado un descenso significativo, ya que muchas de las áreas han sido demolidas, quemadas y otras sufrieron el abandono y la invasión incontrolable de la vegetación indeseable (Vincent *et al.*, 1998).

El incremento de la demanda de fibra natural y de su precio en el mercado internacional actual (1300 CUC/t), ha motivado que el Ministerio de la Agricultura en Cuba esté enfrascado en una recuperación de la industria henequenera, encaminada a sustituir importaciones de ese producto, lo que ha estimulado la puesta en marcha de nuevas fábricas desfibradoras.

A pesar de los esfuerzos realizados, las estrategias para la recuperación henequenera no han dado los resultados esperados, pues la falta de posturas no ha permitido cumplir con los planes de siembra y en la actualidad son más las plantaciones que salen de su ciclo productivo que las que entran en esta fase.

Al igual que otros representantes del género *Agave*, el henequén es un pentaploide ($n = 30$), con reducida fertilidad (Piven *et al.*, 2001), donde la escasa

reproducción sexual que pudiera ocurrir es excluida por la práctica habitual de cortar la inflorescencia (Peña *et al.*, 1997), para evitar los daños que la floración causa a la calidad de la fibra.

Inicialmente este cultivo se propagaba asexualmente a través de los hijos basales o del rizoma, con posterioridad se incorporó la propagación por bulbillos producidos por la inflorescencia y en los últimos años se han desarrollado tecnologías para la propagación a escala de laboratorio. En este sentido la obtención de plántulas a través del cultivo de tejidos vegetales, puede constituir una vía alternativa de propagación que contribuya a obtener una mayor cantidad de posturas en menor tiempo, que al ser llevadas a campo en igualdad de condiciones contribuirán al desarrollo de plantaciones homogéneas de henequén, indispensables para la labores culturales y la cosecha de las hojas en su etapa óptima.

Sin embargo en las plántulas producidas *in vitro* se producen cambios en la anatomía de las hojas, tales como un reducido desarrollo de la cutícula, cierre estomático anormal (Sallanon *et al.*, 1993; Pospisilova *et al.*, 1998), alta densidad estomática (Santamaría *et al.*, 1995) y ausencia o reducido desarrollo de las células de empalizada (Dami y Hughes, 1995), los cuales conllevan a la incapacidad de las plántulas de controlar la pérdida de agua después de ser transferidas a condiciones *ex vitro*.

Estas diferencias anatómicas y fisiológicas entre las plántulas micropropagadas con respecto a las plantas cultivadas en condiciones de campo (Pospisilova *et al.*, 1997), tienen implicaciones en la supervivencia de las mismas, por lo que se hace necesaria una gradual aclimatización a las condiciones medioambientales del invernadero o campo.

En la micropropagación de plantas se conoce con el nombre de aclimatización, adaptación, aclimatación, ciclo de aclimatación, rusticación o Fase IV a la etapa crítica en la que gran cantidad de plantas son transferidas a las condiciones *ex vitro* para ser aclimatizadas gradualmente, proceso que culmina con el

desarrollo de las plantas hasta alcanzar el tamaño comercial (Van Huylenbroeck y Debergh, 1996; Vilchez *et al.*, 2007). Si esa transferencia no se realiza cuidadosamente, puede resultar en una significativa pérdida del material propagado (Robert *et al.*, 1999) y afectarse en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso (Agramonte *et al.*, 1998).

En particular para el cultivo del henequén, la propuesta de una etapa intermedia (previvero), entre la aclimatización y el vivero tradicional, como parte de su ciclo de aclimatización, permite preparar a las plántulas para soportar los rigores de las condiciones de campo de forma menos agresiva, y lograr el desarrollo adecuado que les permita en un tiempo mínimo alcanzar el indicador de calidad establecido en el instructivo técnico (Cuba MINAG, 1986), para entrar en la etapa de vivero tradicional.

En los protocolos de micro propagación propuestos para el cultivo del henequén por Madrigal *et al.* (1990); Robert *et al.* (1992); Peña *et al.* (1997); González (2001) y González *et al.* (2002), no se establecen criterios de calidad para hacer eficiente este proceso.

Por todo lo anteriormente planteado se propone la siguiente **hipótesis** de trabajo:

Se logra elevada eficiencia biológica en la aclimatización de plántulas de henequén con el manejo de factores ambientales y la evaluación de indicadores anatomorfológicos y fisiológicos.

Para validar esta hipótesis se desarrolla el trabajo que se presenta en esta tesis y que persigue los **objetivos** siguientes:

Objetivo general:

- Establecer un manejo para las plántulas de henequén que permita obtener una supervivencia superior al 90 % en un período mínimo de aclimatización, un crecimiento más acelerado y un costo de producción competitivo.

Objetivos específicos:

- Establecer la talla de las plántulas de henequén, el contenido de materia orgánica en el sustrato y el manejo de factores ambientales, que permitan una supervivencia mayor del 90 % durante la aclimatización.
- Caracterizar las plántulas de henequén durante la fase de aclimatización a partir de algunos indicadores anatomorfológicos y fisiológicos.
- Seleccionar el sustrato, el marco y la fecha de plantación, que favorezcan el desarrollo biológico de las plántulas de henequén durante la fase de previvero.
- Determinar el tiempo de aclimatización que garantice la mayor supervivencia y un mejor crecimiento de las plántulas en fase de previvero.

Novedad científica

Se caracterizan por primera vez en el cultivo del henequén, algunos de los cambios biológicos más generales derivados de la micropropagación que se presentan en las plántulas de henequén y sobre esta base se propone un manejo del proceso de aclimatización para lograr niveles de restablecimiento de las estructuras habituales de la especie en un menor tiempo y con un alto porcentaje de supervivencia.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. El Género *Agave*

El género *Agave* pertenece a la familia *Agavaceae*, orden *Asparagales* (Dahlgren *et al.*, 1985), el cual incluye 136 especies. Aunque el centro de origen y diversidad del género *Agave* está limitado a México (Casas *et al.*, 1997; Colunga *et al.*, 1998), después del siglo XVII se distribuyeron prácticamente por todas las áreas subtropicales del mundo, fundamentalmente con propósitos ornamentales.

Con excepción de algunas formas arborescentes como *Agave karwinski* Zucc; los tallos de las plantas son cortos y gruesos en forma de roseta, la cual varía desde pequeña, compacta y globosa como *A. parryi* Engelm, hasta plantas gigantes como *A. mapisaga* Tres, que pueden llegar a medir de 2 a 2,5 m. Las hojas tienen forma lanceolada con una espina en el extremo apical.

2.1.1. Ciclo de vida y reproducción

Las plantas del género *Agave* tienen un período de vida entre 8 y 25 años de acuerdo a la especie, producen hojas nuevas constantemente hasta que alcanzan la madurez sexual, floreciendo solamente una vez en su ciclo de vida. Las flores se desarrollan en el extremo del eje de la inflorescencia, de las cuales muchas son espectacularmente grandes como en *Agave americana* L., que puede alcanzar de 9 a 10 m de altura. Cuando esta inflorescencia se seca ha concluido el ciclo de vida de esta planta (Dahlgren *et al.*, 1985).

La reproducción es fundamentalmente vegetativa, por la producción de tallos subterráneos rizomatosos que se desarrollan en la base de la roseta sobre las raíces. Las hojas de estos brotes están modificadas por pequeñas brácteas que protegen las yemas axilares en reposo. Los rizomas se elongan y eventualmente crecen sobre la superficie formándose en el ápice del rizoma una nueva planta.

El número de nuevas plantas producidas por este proceso es muy variable, algunas forman nuevos brotes cuando la roseta es joven, otra cuando la planta ha florecido. Otra

forma de propagación vegetativa es a partir de los bulbillos formados en el eje de la inflorescencia después de la floración.

2.1.2. Origen y clasificación de las fibras vegetales

Las fibras vegetales propiamente dichas se componen de células largas y delgadas de esclerénquima. Estas células tienen la característica de desarrollar una segunda pared vegetal dentro de la primera, cuando la célula ha completado su crecimiento, con lo que finalmente se conforman paredes celulares mucho más gruesas que en otro tipo de células (Macía, 2006).

Su función es la de dar soporte, dureza y rigidez a los tejidos vegetales. La composición de la pared celular de las fibras vegetales es principalmente de celulosa y en segundo término de lignina, pero también se pueden encontrar taninos, gomas, pectinas y otros polisacáridos. Las fibras se encuentran en varias partes de la planta, corteza, tallo o tronco, ramas, hojas, pero son más frecuentes en los tejidos vasculares.

En función de la localización de la fibra en la planta, se clasifica en tres grupos:

- 1) Fibras blandas, cuando la fibra se encuentra en el floema de los tallos, se presenta en las dicotiledóneas.
- 2) Fibras duras, cuando las fibras se encuentran en el floema de las hojas en forma de haces que se sobreponen unos con otros, lo que los hace más fuertes por su mayor lignificación; se presenta en las monocotiledóneas.
- 3) Fibras de superficie, que corresponde a los pelos de la epidermis de la semilla, por ejemplo en el algodón.

Según Esau (1985), las fibras pueden ser muy acusadas en hojas de monocotiledóneas, donde forman vainas que incluyen los haces vasculares o cordones que se extienden entre la epidermis y dichos haces, e incluso cordones sub-epidérmicos que no entran en contacto con aquellos. Se clasifican en: fibras del xilema, forman parte integral de éste y fibras de otros tejidos (extraxilares), se relacionan al floema.

2.1.3. Importancia económica del género *Agave*

El uso de los *Agaves* es amplio, ya sea como especies ornamentales para la protección del suelo de la erosión, por lo que permite la preservación del paisaje, así como para la producción de alcohol a partir del *A. tequilana* (González *et al.*, 2004), entre otros usos. Sin embargo la mayor importancia económica recae sobre sus fibras, principal producto extraído de las hojas del henequén y el de mayor utilidad en la industria textil, utilizadas tanto en México como en Cuba en la fabricación de sogas, jarcias, cordeles y otros productos (Carrion, 1988; Robert *et al.*, 1992 y González *et al.*, 2004). Desde el punto de vista industrial los agaves más importantes en la producción de fibras son: el *A. fourcroydes* Lem (henequén), el *A. sisalana* Perrine (sisal) y extendido en menor grado *A. lechoquilla* (Robert *et al.*, 1992).

La fibra de henequén se utiliza en la confección de alfombras, aparejos de tiro para carretas y para la confección de forros de cables, excelentes por su flexibilidad, duración y por su resistencia al calor y a los insectos. Además se fabrican hamacas, sombreros, cestos, sacos de todas clases, e hilos agrícolas como el *baler twine* para empacar, y el *bander twine* para engavillar, así como hilos comerciales de uno o más cabos, como es el tipo banco o sin aceite y el aceitado para jarcias y sacos (Carranca, s.a).

En la actualidad se han difundido otros usos de las fibras:

Para reforzar las placas de yeso, lo cual las hace más fuertes y resistentes. Proporcionan excelentes resultados en las correcciones sonoras de las habitaciones destinadas a la música. Mezclada con fibra de vidrio para paneles de relleno utilizable a escala mundial para la confección de viviendas de urgencia en caso de catástrofes naturales (FAO, 1970). Para recubrimiento de pisos. Objetos de artesanía. Cordeles de usos especiales recubiertos de plásticos y sacos para envasar todo tipo de productos (Cuba. INRA., 1975).

Del henequén suelen extraerse un grupo significativo subproductos importantes que convierten a esta especie en una planta muy útil, que puede ser aprovechada íntegramente.

Entre los subproductos de mayor interés se encuentra la pasta de papel, abono e incluso alcohol obtenido por la fermentación del jugo de la pulpa. Rubber (1960) hizo referencia a la posibilidad de obtener otros subproductos con diversos usos, como producción de biogás, que puede ser utilizado para el proceso de secado de la fibra en la propia desfibradora.

La pulpa procedente del desfibrado puede ser utilizada como alimento animal y para la extracción de ceras de uso industrial.

Extracción de hecogenina, producto básico para diferentes fármacos de gran demanda mundial. La hecogenina es un esteroide de la familia de los esteroides corticoides. Los cuales poseen una elevada demanda a nivel mundial en la síntesis de hormonas esferoidales, tales como: hidrocortisona, prednisolona y triamsinolona.

Producción de biodetergentes para el fregado y lavado, y como emulsionante para combustibles.

En la actualidad en el Centro de Estudios Biotecnológico de la Universidad de Matanzas (CEBIO), se realizan estudios para evaluar este cultivo como fitoremediador.

2.2. Origen, distribución y condiciones climáticas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.)

Diversos autores como Ciaramello (1975) coinciden en señalar que este tipo de planta es originaria de las Américas. Esta afirmación se corrobora con el hecho que a la llegada de los conquistadores españoles a este continente, ya los indios mayas hacían uso de esta planta y su fibra. Según Colunga (1996) el henequén fue obtenido por los indios mayas, por selección artificial a partir del *Agave angustifolia*. Ellos lograron clonar diferentes variedades de henequén pero los intereses coloniales y luego los capitalistas, impusieron la variedad "henequén blanco" o Sacki, que es la que se cultiva en Cuba.

El cultivo del henequén se ha desarrollado fuera del estado de Yucatán únicamente en algunas regiones de los estados de Tamaulipas y Veracruz y en Cuba, en estos tres lugares a partir del germoplasma yucateco. Este cultivo se encuentra ubicado entre los

15 y 25 grados de latitud norte (CUBA. MINAGRI, 1986). Por lo tanto fuera de las áreas tropicales, las plantas de henequén son muy escasas. Ello evidencia que mientras más cálido es el clima más se favorece el crecimiento y desarrollo de este cultivo, ya que son especies de regiones áridas incluso desérticas donde pueden crecer con poco o ningún cuidado. Sin embargo con temperatura de 10 grados su ritmo de crecimiento se retarda considerablemente (Otero, 1999).

En Cuba, fue introducido alrededor de 1850 por los monopolios estadounidenses con el objetivo de lograr precios bajos para la compra de la fibra (Carrión, 1988), esta es la razón fundamental de la expansión de este cultivo. Sin embargo no es hasta alrededor del año 1900 cuando empieza a fomentarse este cultivo en Cayo Romano y Nuevitas, provincia de Camagüey, con fines de exportar su fibra, siendo en Matanzas donde se comenzó la siembra de henequén en gran escala con vistas a su industrialización.

2.2.1. Propagación del henequén

La propagación del henequén se realiza de diferentes formas: Mediante la reproducción sexual, por medio de semillas y asexualmente por medio de los retoños producidos por los rizomas (hijos basales), y por bulbillos que son yemas aéreas encontradas en el escape floral (Infante *et al.*, 2003).

En cuanto a la propagación por semillas la inmensa mayoría de los autores coinciden en señalar que esta no es la más adecuada. Por ejemplo, Taylor (1936) (citado por Otero, 1999) señaló que las semillas de los *agaves* se usan raramente debido a que la producción de ellas por las plantas es muy poco frecuente a menos que se realice polinización artificial de las flores. Además las plantas obtenidas por esta vía no manifiestan una talla uniforme, lo cual es una dificultad para el ciclo productivo y necesitan un período prolongado de crecimiento para ser utilizadas, lo cual fue señalado por Zayas (1921) (citado por Otero, 1999), quien no recomienda esta vía.

En general se sugiere que la propagación se realice por medio de vástagos o retoños Taylor (1936) (citado por Otero, 1999), como los bulbillos y los hijos basales.

Los bulbillos se forman en la inflorescencia después de la floración, cada uno de ellos es una plántula completa con un cierto número de hojas pequeñas y raíces adventicias. El pedúnculo o quiole está cubierto por un cierto número de brácteas (cuyo extremo es una aguda espina) que protegen cada una de ellas a una yema axilar. Normalmente estas yemas no brotan pero pueden ser forzadas al podar el quiole en un estado temprano de su desarrollo (Ferwerda y Wit, 1987).

El número de bulbillos producidos por la planta varía según el tamaño de la inflorescencia, en un quiole grande se pueden formar entre 2000 y 3000. Los bulbillos no requieren de cuidados especiales y producirán raíces una vez plantados en suelo húmedo.

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

Ambos tipos de propágulos (hijos basales y bulbillos), son separados de la planta madre y llevados a condiciones de vivero tradicional cuando tienen una talla igual o superior a 14 ó 16 cm y seis hojas o más (Otero, 1999). En esta fase las posturas permanecen por un período de 14 ó 18 meses hasta alcanzar los patrones de calidad (45 o 50 cm de altura) para pasar a plantación definitiva, según establece el instructivo técnico de este cultivo (Cuba MINAG, 1986) y la experiencia de los propios productores. Cuando estos propágulos son recolectados con talla inferior a 14 cm, debido a la escasez de material de plantación en las condiciones actuales, son establecidos en una primera fase de semillero o previvero (Otero, 1999), donde deben alcanzar los patrones de calidad para su trasplante al vivero tradicional.

2.2.1.1. Micropropagación del henequén

Diferentes especies del género *Agave* han sido propagadas por las técnicas del cultivo de tejidos, entre las que se destacan: *A. arizonica*, *A. potatorum*, *A. cantala*, *A. fourcroydes* y *A. sisalana* (Enríquez y Díaz, 1994).

Peña *et al.* (1997) estableció una metodología cubana para la propagación de *A. fourcroydes* Lem. (henequén) a partir de los resultados alcanzados por Robert *et al.* (1992). Posteriormente González (2001) establece una nueva metodología a partir de la utilización de la embriogénesis somática, donde destaca una mayor calidad del proceso para la fase *in vitro*, quedando la fase *ex vitro* limitada solamente a estudios preliminares del proceso de aclimatización.

Enríquez y Díaz (1994), también reflejaron el trasplante de plántulas de *Agave* de las condiciones *in vitro* a sustrato para aclimatización, a partir de lo informado por Madrigal y Pineda (1986), Robert *et al.* (1987), Enríquez *et al.* (1988) y Binh *et al.* (1990). Estos autores mencionan además los resultados obtenidos por Binh *et al.* (1990), donde destacan que plántulas de *Agave cantala*, *A. fourcroydes* y *A. sisalana* fueron trasplantadas del medio de cultivo a un sustrato de arena, para su aclimatización y después de cuatro semanas en este sustrato, aproximadamente el 95% de las plantas formaron nuevas raíces.

El esquema de micropropagación de plantas se divide en varias etapas: establecimiento del cultivo, multiplicación, enraizamiento y aclimatización (Murashige, 1974; Debergh y Maene, 1981 y Chu, 1992). Sin embargo la aclimatización se considera una de las más críticas dentro del proceso de micropropagación, pues es donde el material producido *in vitro* se transfiere a las condiciones *ex vitro*, si esta transferencia no se realiza cuidadosamente, puede resultar en una significativa pérdida del material propagado (Robert *et al.*, 1999). Esto es debido a las alteraciones creadas en la morfología, anatomía y fisiología de las plántulas como consecuencia del ambiente *in vitro*, lo que dificulta su adaptación a las condiciones naturales. Como consecuencia un gran número de plántulas micropropagadas no sobreviven cuando son transferidas de las condiciones *in vitro* a las casas de cultivos o campo (Preece y Sutter, 1991; Pospíšilová *et al.*, 1999;

Rogalski *et al.*, 2003). En el proceso de micropropagación de henequén tras una primera etapa de su período de aclimatización las plántulas no adquieren la talla necesaria (15 cm) para ser establecidas en el vivero tradicional, es por ello que son trasplantadas a condiciones de previvero hasta alcanzar la talla de plantación en vivero. En tal sentido tratar de alargar la primera etapa de la aclimatización en función de cumplir el objetivo anterior supone un gasto innecesario de recursos.

Aunque González (2001) propuso un período de aclimatización de 45 días para las plántulas de henequén, no realizó una evaluación detallada de esta etapa, por lo que se hace necesario un estudio más profundo en la evolución histológica y el comportamiento de diferentes indicadores del crecimiento y desarrollo entre otros en plántulas de henequén, antes de la fase de vivero, lo cual brindará una información detallada para la toma de decisiones en la micropropagación a gran escala.

2.3. Características morfo-fisiológicas de las plántulas como consecuencia de las condiciones *in vitro*

Durante el cultivo *in vitro* las plántulas crecen bajo condiciones especiales que generalmente incluyen un ambiente cerrado y aséptico, con reducido intercambio gaseoso, alta humedad relativa, baja intensidad luminosa y medios de cultivo ricos en compuestos orgánicos, especialmente sacarosa como fuente de carbono y energía. Estas condiciones provocan cambios en la anatomía y fisiología de las plántulas, que las hacen diferentes de las cultivadas en condiciones de campo o casas de cultivo (Kozai, 1991; Preece y Sutter, 1991; Pospíšilová *et al.*, 1992, 1997 y 1999; Desjardins, 1995a,b; Kozai *et al.*, 1995a).

Debido a la elevada humedad del aire en los frascos de cultivo, las plántulas no necesitan restringir el intercambio de gases y como consecuencia se produce retardo en el desarrollo de la cutícula, de las ceras epicuticulares y en el funcionamiento del aparato estomático (Brainerd y Fuchigami, 1981; Sutter, 1985; Debergh y Zimmerman, 1991; Debergh *et al.* (1992), por consiguiente tienen lugar altas tasas de transpiración estomatal y cuticular cuando son transferidas a las condiciones de campo o invernadero.

Las hojas formadas *in vitro* no son capaces de mantener un equilibrio hídrico cuando son transferidas a las condiciones *ex vitro*, ocurriendo así un estrés y una reducción del crecimiento y de los procesos fotosintéticos (Preece y Sutter, 1991). El potencial hídrico de las hojas o brotes desarrollados *in vitro*, se corresponde con el medio de cultivo. Como la diferencia entre el potencial hídrico del medio y el de la plántula es pequeña, el transporte de agua y quizás también de nutrientes es muy bajo (Desjardins *et al.*, 1988), en lo cual influye además una deficiente o incompleta conexión vascular entre la raíz y el brote de la plántula (Framton *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2005).

En relación a los estomas, estos son redondos en lugar de elípticos, levantados con respecto a la epidermis y con paredes más finas (Preece y Sutter, 1991; Ross-Karstens *et al.*, 1998; Pospisilova *et al.*, 1999), además presentan alteraciones en la forma de las células oclusivas y menores niveles de cutina, pectinas y celulosa en la pared celular de estas células (Ziv *et al.*, 1987; Ziv, 1991; Diez y Gil, 1999), lo que explica su incapacidad para cerrarse bajo condiciones que normalmente lo provocarían.

La escasa funcionalidad de los estomas está también relacionada con la limitada capacidad de las plántulas desarrolladas *in vitro* para producir ácido abscísico (ABA), lo que puede influir en el mecanismo de cierre y apertura estomático (Brainerd y Fuchigami, 1992; Santamaría *et al.*, 1993). Aunque se ha observado en estomas de hojas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) con rasgos de hiperhidricidad que estos no cierran, incluso cuando el potencial osmótico de las células oclusivas se incrementa en respuesta al ABA o cuando son plasmolizadas en solución de sacarosa. Así, para estas hojas el ABA funciona como una señal para el cierre estomático, pero otros factores, que pueden estar relacionados con las paredes celulares, evitan el cierre del ostiolo (Pospisilová *et al.*, 1997). Sin embargo Aguilar *et al.* (2000) y Majada *et al.* (2000), empleando tratamientos de ventilación a los frascos de cultivo observaron modificaciones en las características anatómicas de los brotes y hojas, en cuanto a engrosamiento de la cutícula, incremento en el tamaño de las células, reducción de los espacios intercelulares y aumento en el grosor de la pared celular.

Las plántulas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) originadas *in vitro*, bajo condiciones de muy alta humedad relativa y luz constante, carecen de ceras epicuticulares y pocos estomas con desarrollo incompleto (Robert *et al.*, 1992).

El mesófilo de las hojas en las plántulas cultivadas *in vitro*, posee un tejido de empalizada pobremente desarrollado, formado por una sola capa de células, fundamentalmente compuesto por tejido esponjoso con grandes espacios intercelulares (Brainerd y Fuchigami, 1981; Debergh y Zimmerman, 1991; Kozai *et al.*, 1992). Los tallos desarrollados *in vitro* tienen bajos contenidos de lignina, las paredes celulares son finas y tienen grandes espacios intercelulares y limitado desarrollo de los tejidos vasculares (Ziv, 1995). La zona de transición entre la raíz y el tallo es anormal, con conexiones vasculares débiles y mal formadas, lo que frecuentemente restringe la toma de agua (Grout y Aston, 1977 y Martínez *et al.*, 2005).

Las raíces *in vitro* contienen numerosos granos de almidón, abundantes espacios intercelulares y son generalmente hipertróficas con una longitud muy grande y tejido vascular primario, mientras que las raíces *ex vitro* presentan células más uniformes y compactas, con tejidos vasculares primarios y secundarios (McClelland *et al.*, 1990).

De forma general, las raíces pueden ser inducidas bajo condiciones *in vitro* o *ex vitro* por las auxinas, pero las producidas *ex vitro* están mejor adaptadas para sobrevivir la etapa de aclimatización, contrario a las que se forman en los medios con agar, que normalmente son adventicias y con conexiones vasculares pobremente desarrolladas. Por ello su contribución inmediata a la supervivencia de las plantas es inconclusa y depende de la técnica usada y de la especie (Preece y Sutter, 1991).

El empleo de sucesivos subcultivos (más de ocho) en medios de multiplicación con alterada concentración de 6 BAP, retrasan el enraizamiento en plántulas de henequén, según informa Garriga *et al.* (2006).

2.3.1. Fotosíntesis en condiciones *in vitro*

Como consecuencia del cultivo *in vitro*, las plántulas presentan ineficiencia para realizar los procesos fotosintéticos, debido fundamentalmente a los bajos contenidos de

pigmentos fotosintéticos y el desarrollo de cloroplastos con granas desorganizadas, (Preece y Sutter, 1991; Grout y Donkin, 1987; Pospíšilova *et al.*, 1997), sin embargo se ha confirmado determinada capacidad fotosintética en varias especies de plantas en condiciones *in vitro* (Pospíšilova *et al.*, 1997; Van Huylenbroeck *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2001).

Tradicionalmente el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ha implicado un comportamiento heterotrófico de las plántulas que se desarrollan en frascos cerrados, a expensas de las fuentes de carbono aportadas por el medio de cultivo (Murphy *et al.*, 1998). No obstante este comportamiento podría modificarse, propiciando un ambiente en los frascos de cultivo más parecido a las condiciones *in vivo*. La fotoautotofía se puede estimular a través de la reducción de los carbohidratos en el medio de cultivo, aumentando la intensidad luminosa y elevando la concentración de CO₂ (Kozai e Iwanami, 1988; Kozai, 1991; Kirdmanee *et al.*, 1995b).

Según Kozai *et al.* (1995b), la fotosíntesis de las plántulas no es restringida primariamente por el pobre desarrollo del aparato fotosintético, sino principalmente, por la baja concentración de CO₂ durante la incidencia de la luz en los frascos de cultivo cerrados. La posibilidad de que las plantas alcancen un balance positivo de CO₂ *in vitro*, depende principalmente de la composición del ambiente gaseoso (Desjardins, 1995a,b), en lo cual influyen las distintas cubiertas que se emplean para tapar los frascos de cultivo, las cuales se han diseñado para evitar la entrada de contaminantes, y consecuentemente, restringen el intercambio de gases entre el interior y el exterior de los frascos.

Varios autores, (Van Huylenbroeck y Debergh, 1992; Deng *et al.*, 1993; Desjardins, 1995b; Kirdmanee *et al.*, 1995a; Heo *et al.*, 1996; Seko y Kozai, 1996) han valorado considerables incrementos en el crecimiento de las plántulas enriquecidas con CO₂. Parte de este beneficio se debe al alargamiento del período en que las plantas pueden asimilar CO₂ atmosférico. Además, la alta concentración de CO₂ puede reducir también la actividad de la RUBISCO, lo que disminuye la fotorrespiración (Desjardins *et al.*, 1995a; Walting *et al.*, 2000).

En resumen existen distintas respuestas de las plántulas a las diferentes condiciones *in vitro* en que se desarrollan, éstas tienen un efecto directo en el adecuado desarrollo de la estructura y el funcionamiento de los órganos y de los organelos celulares (Rodríguez, 2005).

2.4. Proceso de aclimatización de plántulas

El proceso de aclimatización de plántulas es uno de los pasos críticos de la micropropagación (Van Huylenbroeck y Debergh, 1996), debido a que se producen cambios bruscos en los niveles de dióxido de carbono, la iluminación y la humedad relativa, entre otros. Dichos cambios constituyen fuente de estrés para las plántulas cuando son transferidas a las casas de cultivo o campo (Pospisilova *et al.*, 1999 y 2000).

Las condiciones de más baja humedad relativa y mayor intensidad de luz en los ambientes séptico de los exteriores, asociados a las alteraciones morfológicas, anatómicas y fisiológicas de las plántulas micropropagadas, como consecuencia del ambiente *in vitro*, provocan incapacidad de las plántulas para controlar las pérdidas de agua durante las primeras semanas de la aclimatización y para realizar procesos fotosintéticos eficientes, por lo que un número sustancial de ellas no sobreviven después del trasplante (Preece y Sutter, 1991; Pospisilova *et al.*, 1999; Aguilar *et al.*, 2000).

Kozai *et al.* (1991) resumen en tres aspectos fundamentales la respuesta de las plantas micropropagadas luego de la transferencia a la aclimatización:

- 1) Balance negativo de CO₂ para las primeras dos semanas (producido por la supresión de la fotosíntesis, fotoautotrofia incompleta), tasas de crecimiento negativas.
- 2) Excesiva transpiración (insuficiencia en el control de la pérdida de agua), dificultad en la toma de agua, dificultad en la toma de nutrientes.
- 3) Retardo del crecimiento o muerte de las plantas debido a lo antes mencionado.

Al respecto, la mayoría de los investigadores coinciden en destacar que las plántulas, cuando se trasplantan a condiciones *ex vitro*, necesitan algunas semanas de sombra para iniciar su aclimatización, con una disminución gradual de la humedad relativa, para

evitar la desecación y la fotoinhibición (Bolar *et al.*, 1998; Pospisilova *et al.*, 1999). De esta forma se logra recuperar las anomalías presentes en las plántulas al inicio de la aclimatización y se eleva la supervivencia (Desjardines, 1995a).

De acuerdo con las consideraciones hechas, algunos autores para aumentar el porcentaje de supervivencia durante la aclimatización, trabajan en preparar las plántulas desde las condiciones *in vitro*, empleando ventilación forzada (frascos con orificios en la tapa) para lograr en la fase de aclimatización incrementos de los parámetros del crecimiento de las plántulas y una disminución de la tasa transpiratoria (Deng *et al.*, 1993; Yue *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1998; Aguilar *et al.*, 2000). Vandereschaege y Debergh (1987) aplicaron una variante para reducir la humedad relativa, que consistió en colocar los frascos sobre una lámina fría, lo que provocó que el vapor de agua se condensara y que disminuyera la humedad relativa en el interior de los vasos de cultivo.

Por otra parte autores como (Jeong *et al.*, 1995; Cappellades *et al.*, 1991; Heo *et al.*, 1996 y Kozai *et al.*, 1995a) trabajaron sobre modificar la concentración de azúcar del medio, la concentración de CO₂ y el flujo de fotones fotosintéticos para buscar mejores respuestas de las plántulas en la fotosíntesis y el crecimiento. En este sentido, retirar el azúcar del medio junto a un aumento de la concentración de CO₂ mejora la fotosíntesis (Jeong *et al.*, 1995). Sin embargo, según Ziv (1995) se debe tener presente la etapa del cultivo y la especie en cuestión ya que de acuerdo con este autor, es difícil asumir que una pequeña yema, sin primordio radical y limitada área foliar, durante la etapa de multiplicación, pueda desarrollarse sin una fuente de carbono.

La importancia de los procedimientos de aclimatización *in vitro* y el valor incalculable que estos pueden tener, no pueden menospreciarse para lograr plantas de mayor calidad y disminuir los costos, sin embargo hay que decir que la aclimatización *ex vitro* sigue siendo una etapa necesaria en cualquier protocolo de micropropagación convencional. Durante el proceso *ex vitro*, la humedad relativa, densidad de flujo de fotones fotosintéticos y la temperatura son los factores ambientales que más afectan la supervivencia y la fotosíntesis neta de las plántulas (Debergh, 1991; De Rieck *et al.*, 1991; Kirdmanee *et al.*, 1994).

Otra forma de considerar la transferencia de las condiciones *in vitro* a sustrato e invernadero, es en cuanto al enraizamiento de las plántulas. En este aspecto de manera general se pueden considerar dos posibilidades: a) cuando ocurre el enraizamiento *in vitro* y se realiza la transferencia de plantas al suelo y b) cuando los brotes se transfieren de las condiciones *in vitro* para su enraizamiento *in vivo* y aclimatización (Enríquez y Díaz, 1994).

Está demostrado que las raíces pueden ser inducidas bajo condiciones *in vitro* o *ex vitro* por las auxinas, pero las producidas *ex vitro* están mejor adaptadas para sobrevivir la etapa de aclimatización.

Al respecto Debergh y Mane (1981) y Torres (1989), han puesto objeciones al enraizamiento *in vitro* de las plántulas, debido a:

- a) Que el enraizamiento *in vitro* de brotes es una labor que ocupa mucha mano de obra y que esta etapa es responsable de al menos el 35% del costo de las plantas producidas *in vitro*.
- b) Usualmente hay un retraso en el crecimiento de brotes enraizados *in vitro* después de la transferencia fuera del medio de cultivo.
- c) Es difícil inducir un buen funcionamiento del sistema radical producido *in vitro* y se ha observado que dos semanas después del trasplante del medio de cultivo a suelo, las raíces formadas *in vitro* han muerto y nuevas raíces comienzan a desarrollarse.

De manera general, la tendencia en la micropropagación convencional para el proceso de aclimatización, está frecuentemente en: 1) Colocar las plantas en condiciones de alta humedad relativa y 2) Una gradual disminución de la humedad relativa y un incremento gradual de la intensidad de luz a través del tiempo (Donnelly *et al.*, 1985; Preece y Sutter, 1991).

Por su parte Thorpe y Biondi (1982) en relación con la transferencia de las plántulas de las condiciones *in vitro* al suelo, plantean considerar cinco factores:

- a) Que exista un balance adecuado entre tallo y raíz.

- b) Debe haber una transición gradual de la humedad relativa.
- c) Se debe eliminar el agar.
- d) Se deben dar tratamientos con fungicidas.
- e) Debe haber una transición gradual de la intensidad lumínica.

La etapa de aclimatización en los protocolos de micropropagación de henequén, no refleja lo complejo de este proceso, en ninguno de los casos los autores han establecido las condiciones que se le deben proporcionar a las plántulas para ser transferidas del medio de cultivo al sustrato. No obstante, Robert *et al.* (1999) inducen un pretratamiento *in vitro* que consiste en incrementar la solidez del medio, es decir hacer más negativo el potencial hídrico de éste, lo que favorece la deposición de ceras epicuticulares y con ello se produce la preadaptación de las plántulas.

Por otra parte en los protocolos de henequén donde se utiliza luz natural en las etapas desarrolladas *in vitro* (Peña *et al.*, 1997; González *et al.*, 1997) no se evalúa la repercusión de la luz natural en la aclimatización, dado que este factor puede tener una influencia grande en el desarrollo de las ceras epicuticulares y del complejo estomático.

2.4.1. Manejo de las plántulas

El manejo de las plantas en la fase de aclimatización debe realizarse mediante un proceso gradual y sin crear traumas si se quiere obtener plantas de calidad, capaces de mostrar un alto grado de homogeneidad cuando son cultivadas en el campo (Agramonte *et al.*, 1998). En este aspecto un esquema valioso es el procedimiento creado por el Instituto de Biotecnología de Plantas (IBP) para la aclimatización de plántulas (Agramonte *et al.*, 1998):

- Lavar cuidadosamente las plantas para eliminar restos de agar de los brotes y raíces.
- Colocar las plantas en agua destilada durante 12- 16 horas antes de la plantación.
- Clasificar las plantas por tamaño y de ser posible individualizar brotes múltiples.
- Sumergir las raíces en una solución fungicida (Benomyl 0,1% + Monceren 3g/L) para protegerlas de posibles ataques de hongos.

- Aplicar una solución de brasinoesteroides por inmersión de las raíces (0,1 mg/L) para incrementar la emisión de las mismas y el crecimiento integral de las plantas.
- Realizar la plantación en un sustrato que garantice una adecuada sanidad y el crecimiento de las plantas.
- Mantener una alta humedad relativa (80 – 90 %) durante las primeras dos semanas, aplicando una mayor frecuencia de riego de corta duración y reducir durante este período la intensidad luminosa entre un 50 y 70 %.
- A partir de la segunda semana incrementar progresivamente la luz hasta lograr una reducción entre un 15 – 20 % y espaciar los riegos.
- Fertilización tan pronto se haya establecido el sistema radicular. Esto normalmente ocurre a los dos semanas después de la plantación.

2.4.2 Sustrato

El papel demostrado por el sustrato en el proceso de aclimatización, hace que este sea uno de los factores más estudiados en las biofábricas especializadas, dado por la carencia de un material único, de reconocida calidad y con la debida certificación que garantice el adecuado crecimiento y desarrollo de las plántulas en un corto período de tiempo.

Según Abad (1998), se considera sustrato, a los materiales sólidos y porosos de origen natural o sintético, que solos o combinados garantizan un adecuado crecimiento de las plantas bajo condiciones ambientales controladas. Éstos tienen como función dar a la planta sostén mecánico y a la vez permiten que las raíces tomen aire y agua, éste puede o no intervenir en el complejo proceso de la nutrición vegetal (Tortosa, 1990), citados por Agramonte *et al.* (1998).

Hartmann *et al.* (1997) establecen diferentes características que debe tener un sustrato para obtener buenos resultados con su empleo, aunque estos autores se refieren fundamentalmente a los sustratos empleados para enraizar estacas y germinar semillas. No obstante para el caso de las plántulas, se ha determinado que las características son esencialmente las mismas, las cuales se resumen en los siguientes aspectos según Rodríguez (2005):

- El medio debe ser lo suficiente firme y denso para sostener las estacas o semillas en su lugar durante el enraizamiento o germinación.
- Debe retener suficiente humedad (40-50 %) de modo que no sea necesario regar con mucha frecuencia.
- Debe ser suficientemente poroso para facilitar el drenaje, permitiendo la adecuada penetración de oxígeno a las raíces (10-20 %).
- Debe estar libre de semillas de malezas, nemátodos y patógenos.
- No debe tener un alto nivel de salinidad, conductividad eléctrica menor de 1,75 mohm/cm.
- Debe ser capaz de ser pasteurizado por calor o con productos químicos sin que sufra daños.
- Debe proveer adecuada nutrición en situaciones en que las plantas deben permanecer por largos períodos aunque generalmente se recomienda el empleo de fertilizantes de lenta liberación. Retención de nutrientes de 79-190 meq/100g.
- Mantener el pH entre 5,5 - 6,5.

Además de estas características, se señala que las mezclas de sustratos deben ser fácilmente reproducibles y disponibles. Otro aspecto importante destacado por Ball (1998), es que el productor debe ser capaz de reproducir una mezcla particular siempre y debe permitir manejarse las condiciones de la misma, de forma tal que el drenaje y los requerimientos de fertilizantes incrementen los niveles de supervivencia y el ritmo de crecimiento del cultivo.

En relación a la calidad de los sustratos, Paneque (1998) refiere, que cuando se necesita establecer sustratos orgánicos, utilizando mezcla con suelo, zeolita u otro material, es necesario tomar en cuenta factores que rigen ese tipo de mezcla y que determinan la eficiencia que se logre en los sistemas de cultivo que se pongan en explotación.

Esos factores son:

- Contenido de materia orgánica de la mezcla.
- Análisis químico del abono orgánico para conocer su contenido de humedad, materia orgánica y elementos nutritivos.

- Análisis químico del suelo u otro material para preparar el sustrato.
- Conocer la densidad aparente del abono orgánico y del suelo que se vaya a utilizar para la mezcla.

Diferentes trabajos de la literatura nacional e internacional citan materiales orgánicos que en su estado natural o combinados constituyen sustratos eficientes para la aclimatación de las plántulas (Ortiz *et al.*, 1998a; Tellez *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2000; Favaro *et al.*, 2002; Viegas *et al.*, 2005).

Algunos de los sustratos o componentes más empleados en Cuba son:

- Turba

La turba está formada por restos de vegetación de pantano o ciénaga que han sido preservados bajo el agua en un estado parcialmente descompuesto. La carencia de oxígeno en la ciénaga limita la descomposición bacteriana y química del material vegetal. La composición de los diferentes depósitos de turba varía en dependencia de la vegetación a partir de la cual se origina, el estado de descomposición, el contenido de minerales y la acidez inciden directamente en los resultados que se desean alcanzar (Whittle, 1987).

- Arena

La arena consiste de pequeñas partículas (0.05 -2 mm de diámetro), cuya composición mineral depende del tipo de roca. Es el más pesado de todos los sustratos para enraizar estacas o el cultivo de plantas en vivero. Esta debe ser fumigada o pasteurizada en estufa antes de usarla, pues pueden contener semillas de malezas y varios patógenos. La arena no contiene nutrientes minerales y no tiene capacidad de intercambio catiónico, por ello es empleada fundamentalmente en combinación con materiales orgánicos (Hartmann *et al.*, 1997).

- Zeolitas

Son aluminosilicatos hidratados, generalmente sódicos, su estructura es cristalina, semejante a un panal que permite la entrada de iones potasio (K^+) y amonio (NH_4^+) que actúan como fertilizantes de lenta liberación, mezcladas con turba pueden alcanzar una

capacidad de cambio catiónico de 250-300 meq/L. Son capaces de retener agua utilizable por las plantas lo cual reviste gran importancia, ya que se puede reducir el número de riegos, con el consiguiente ahorro de agua y energía (Agramonte *et al.*, 1998).

En la aclimatización de plántulas, se han empleado diferentes sustratos constituidos por zeolita y su combinación con otros materiales orgánicos en distintas proporciones. Los resultados han demostrado que con el empleo de la zeolita sola o combinada, se alcanzan mayores porcentajes de supervivencia, que cuando se utilizan materiales orgánicos individuales (Terán *et al.*, 1996; De la Fé *et al.*, 1998; Ortiz *et al.*, 1998a, b).

- Cachaza

La cachaza es un residuo del proceso de clarificación del jugo de la caña de azúcar, que consiste en una mezcla de fibras, sacarosa, tierra, cera, compuestos albuminoides y algunos elementos como fósforo, nitrógeno y calcio. Sus contenidos de potasio son bajos (Urquiza *et al.*, 1980).

- Humus de lombriz

Se produce por la descomposición de residuos orgánicos por lombrices especializadas que tienen la facultad de producir humus de alta calidad.

- Residuo orgánico de pulpa de henequén descompuesta

Se obtiene como resultado del proceso de descomposición de la pulpa de henequén, que es uno de los subproductos del proceso de despulpado de la hoja en la obtención de la fibra, por su riqueza se ha considerado por los productores como un abono orgánico de alta calidad, (Anexo 2, Tabla 1). En este trabajo se realiza una evaluación del comportamiento del crecimiento y desarrollo de plántulas de henequén en una mezcla de materiales, utilizando pulpa de henequén descompuesta y zeolita.

2.4.3. Manipulación de la luz en las casas de cultivo

El control de la intensidad lumínica es uno de los manejos más importantes durante la fase de aclimatización, ya que las plantas provienen de un ambiente con baja intensidad lumínica y son transferidas a uno con alta intensidad, lo cual puede causar lesiones

severas del follaje, fotoinhibición y fotodegradación de las clorofilas (Van Huylembroeck, 1994; Van Huylembroeck *et al.*, 1995).

Evaluando el manejo de la luz en los cultivos de caña de azúcar y piña durante la aclimatización, González *et al.* (1999) y Rodríguez *et al.* (2000) encontraron que las plántulas son muy dependientes de la intensidad lumínica en las cuales son colocadas, destacando además que el manejo de la intensidad luminosa es un aspecto importante para acelerar el tránsito de las plantas por el área de aclimatización, para que una vez lograda la supervivencia, éstas crezcan y se desarrollen rápidamente, para hacer eficiente el proceso de propagación y utilizar con mayor frecuencia las instalaciones especializadas dedicadas a estos fines.

Para atenuar el efecto de la luz se emplean mallas plásticas de diferentes porcentajes de sombreo durante las primeras semanas, éstas se retiran gradualmente, hasta que las plantas son expuestas al mayor porcentaje de luz posible, lo cual incrementa su adaptación a condiciones de campo. En algunas instalaciones estas mallas son fijas, pero en otras son móviles, que es la variante más conveniente por la flexibilidad que requiere esta manipulación (Agramonte *et al.*, 1998).

En el proceso de aclimatización del henequén en los protocolos anteriormente citados, no se valoran diferentes intensidades de luz, por lo que constituye una variable de estudio en este trabajo.

2.4.4. Manejo de la humedad relativa

Debido a que las plantas provenientes del cultivo *in vitro* no son capaces de regular su economía hídrica, por los desórdenes provocados en la morfología, anatomía y fisiología de las plántulas, como ya se destacó anteriormente, éstas deben ser mantenidas en condiciones de alta humedad relativa en el período inicial de aclimatización, prácticamente simular las condiciones del ambiente *in vitro* hasta que las plantas se adapten (Van Huylembroeck y De Rieck, 1995; Santana *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 2005). En etapas posteriores esta exigencia se tiende a disminuir por parte de las plántulas, y la humedad relativa se disminuye gradualmente hasta alcanzar los niveles del ambiente externo (González *et al.*, 1999).

Para el control de la humedad relativa en las casas de cultivo se emplean varios sistemas:

- Sistemas cerrados

Se trata de túneles de polietileno que logran una reducción de la pérdida de agua de las hojas, por el resultante incremento de la humedad relativa; pero estos sistemas tienden a conservar el calor. El tejido de la hoja no se enfría debido a que hay un mínimo movimiento de aire y enfriamiento evaporativo. Para reducir el calor, se regula la intensidad de luz con sombra (Hartmann *et al.*, 1997). Empleando este sistema Etienne *et al.* (1997) alcanzaron altos porcentajes de supervivencia en plántulas de café con sólo tres riegos diarios.

- Nebulización intermitente

Estos sistemas crean una lámina de agua sobre las plantas y el sustrato. De este modo, la pérdida de agua, tanto de la hoja como de su alrededor, se reduce por la reducción de la temperatura que se produce al evaporarse el agua y además por el aumento de la humedad relativa (Van Huylenbroeck *et al.*, 1995; Hartmann *et al.*, 1997). Estos sistemas son ampliamente empleados en la propagación por estacas de diferentes especies para garantizar la no desecación de las mismas y obtener altos porcentajes de supervivencia (Rodríguez *et al.*, 1998).

- Sistemas de roseta

Son sistemas que provocan gran dispersión de las gotas de agua (50–100 μm), permitiendo que el agua quede suspendida por varios segundos como una nube, estos sistemas elevan la humedad relativa y evitan el sobre humedecimiento del sustrato (Hartmann *et al.*, 1997).

- Sistemas de niebla

Son generadores de niebla o atomizadores que producen gotas (20 μm). Estos sistemas elevan la humedad relativa hasta 93-100 %. El agua queda suspendida en el aire como vapor, mientras las gotas mayores pierden su suspensión y caen a la planta y al sustrato (Hartmann *et al.*, 1997).

2.4.5. Control fitosanitario

La humedad del suelo es un factor que propicia notablemente la aparición de enfermedades transmitidas por el suelo al influir sobre el hospedante y sobre el parásito. Los suelos con alta retención de humedad generalmente favorecen la aparición de enfermedades radicales (Mayea y Herrera, 1994).

Las plantas provenientes del cultivo *in vitro* son más susceptibles al ataque de plagas y enfermedades, cuyos agentes causales pueden estar presentes en el sustrato o en el ambiente de la instalación (Yanes *et al.*, 2000; Rodríguez, 2005).

La susceptibilidad de las plántulas a los procesos de pudrición, potencialmente pueden ser estimulados debido a la alta humedad relativa presente en el ambiente, favorecidos por un proceso de necrosis que normalmente ocurre en las raíces producidas *in vitro* (Debergh y Maene, 1981; Viegas *et al.*, 2005), cuando se hace el trasplante a sustrato en las casas de aclimatización.

De acuerdo con Yanes *et al.*, 2000 y Rodríguez, 2005, la desinfección del sustrato ya sea por vía química (formalina) o física (calor por solarización, estufa o autoclave) es una medida efectiva para disminuir las pérdidas provocadas por patógenos que se encuentran en el sustrato. La utilización de agentes biológicos con hongos antagonistas como *Trichoderma viride* también es una alternativa de control eficiente de la manifestación y acción de otros microorganismos indeseables (Agramonte *et al.*, 1998; Companioni *et al.*, 1998). Este efecto secundario lo han ejercido tratamientos con micorrizas y azotobacter en los sustratos empleados en la aclimatización de plántulas de piña (*Ananas comosus* L.) (Expósito *et al.*, 1993; González *et al.*, 1995).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO) de la Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos".

3.0. Técnicas y procedimientos generales

a - Selección del material vegetal

En todos los estudios realizados se utilizaron plántulas procedentes del protocolo de micropropagación establecido por González (2001) (Anexo 1). Las plántulas fueron enraizadas *in vitro* durante 30 días en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con las sales de nitrógeno ligeramente modificadas por Robert *et al.* (1992).

b - Preparación del material vegetal

Las plántulas seleccionadas fueron extraídas de los frascos de cultivo y lavadas cuidadosamente con agua corriente para eliminar los restos de agar de los brotes y raíces. Las raíces producidas *in vitro* fueron podadas para facilitar el establecimiento de las plántulas en el sustrato y evitar posible pudrición por contaminación.

Las plántulas de los lotes utilizados para establecer cada experimento fueron clasificadas de acuerdo con su tamaño y seleccionadas teniendo en cuenta los objetivos de cada ensayo, en todos los casos se sometieron a un período de 10 horas de imbibición en agua destilada antes del trasplante y en el momento de la siembra en la bandeja la parte basal y la zona de las raíces se sumergieron en una disolución de oxiclورو de cobre con una concentración de $14,5 \text{ g L}^{-1}$ (De Faz y De Cossio, 1983), de acuerdo con lo informado por Martínez *et al.* (2005). Posterior al tratamiento con este fungicida las plántulas no fueron lavadas para su plantación.

c - Condiciones generales del proceso de aclimatización

Las plántulas se establecieron en bandejas de poliespuma de 247 alveolos (47 x 69 cm, volumen de alveolo 30 cm³).

El proceso de aclimatización se desarrolló en casa de cultivo con manejo de la intensidad luminosa [flujo de fotones fotosintéticos (FFF)], a través de diferentes condiciones creadas con el empleo de capas de malla Zaran de color negro (Agramonte *et al.*, 1998; Escandón *et al.*, 2003; Traore *et al.*, 2003; Viegas *et al.*, 2005.). Para la medida del paso de la luz se utilizó un luxómetro del tipo PU 150. Se empleó el factor 0.0185 para la conversión a $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Thimijan y Royal, 1982).

Para mantener la humedad relativa (HR) por encima del 90 %, se estableció un sistema de riego localizado a través de la técnica de microjet, con emisores M₂-r -140 x 1.0, con un caudal de 36 L/h y carga de 15 m.c.a que produce una alta pulverización de las gotas de agua en forma de neblina. Esta condición se logró con la aplicación de 14 riegos, con un intervalo de 30 minutos y una duración de cinco minutos, de forma diaria entre las 9:00 am y las 4:00 pm, durante los primeros 15 días. Posteriormente la humedad relativa se mantuvo al 80 %, con la ampliación del intervalo de riego a 60 minutos, disminuyéndose en un 50% el número de riegos. El control de la humedad relativa y la temperatura se realizó con un hidrotérgrafo del tipo VEB.

Por la posición del sistema de riego descrito anteriormente, el cual se colocó en la parte superior del área de aclimatización, no se garantizó el humedecimiento del sustrato. Este se logró con intervalo de un riego diario, para lo cual se estableció una instalación específica para este objetivo, de acuerdo con el sistema de riego descrito anteriormente. El tiempo de riego fue de dos minutos, de manera fraccionada, en un minuto en horas de la mañana y un minuto en horas de la tarde. El volumen aplicado diario fue de 1,2 L m⁻² (Otero *et al.*, 2000).

La temperatura osciló entre 23-27°C de acuerdo con las condiciones ambientales naturales.

El material orgánico utilizado en el sustrato, fue pulpa de henequén descompuesta, tamizada a un diámetro de 6 mm. Las características químicas de este material se describen en el Anexo 2 (Tablas 1 y 2).

d - Condiciones generales del crecimiento en previvero

Para esta fase se utilizaron canteros de hormigón con un área de 2,5 m², y una profundidad de 0,40 m, ubicados en condiciones naturales.

Durante las 10 primeras semanas se aplicó un riego diario con una dosis de 1,5 L m⁻², de acuerdo con Otero *et al.* (2000), con un volumen de entrega para el área del cantero de 3, 75 L, posteriormente el intervalo de riego se amplió a dos días. Se utilizó un sistema de riego localizado con la técnica microjet, con emisores M₂-r -140 x 1.0. El riego fue suspendido durante los períodos en que ocurrieron precipitaciones.

3.1. Efecto de la calidad de las plántulas en la supervivencia, en el momento de salida de las condiciones *in vitro* a las *ex vitro*

Se hizo un análisis de la distribución de frecuencia de la talla para establecer categorías de plántulas. Para ello se tuvo en cuenta criterios establecidos por Agramonte *et al.* (1998), Ortíz (2000) y Yanes *et al.* (2000). Se seleccionaron al azar tres poblaciones independientes de 50 frascos de la fase *in vitro* en el momento de su salida para la aclimatización. A las plántulas contenidas en cada uno de estos frascos se le midió su tamaño (talla), desde la base del pseudotallo (punto de inserción con las raíces), hasta la altura de las hojas más desarrolladas, se empleó una regla graduada con precisión de 1mm. De esta manera, se establecieron grupos o categorías de plántulas de acuerdo con su talla.

El efecto de la calidad de las plántulas en la supervivencia durante la aclimatización se realizó al total de plántulas provenientes de 25 frascos, las cuales se sometieron a los procedimientos que se explican en los epígrafes 3.0 (a, b y c). En este caso las plántulas se mantuvieron durante 60 días bajo condiciones controladas de intensidad de flujo de fotones fotosintéticos ($558,74 \leq \text{FFF} \leq 686,55$

$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), con el empleo de mallas que permitían el paso del 30 % de la luz solamente y bajo condiciones de humedad relativa (HR) superiores o igual al 90 %.

Las plántulas fueron clasificadas de acuerdo a los cuatro grupos o categorías establecidos, los cuales constituyeron las variantes en estudio. El número de hojas (No hojas) y la masa fresca de la planta (Mf.P) de cada plántula por categoría fueron medidos al momento de su salida de la fase *in vitro*. La masa se determinó en balanza analítica Sartorius (precisión 0,1mg); el número de hojas se determinó por el conteo del número total de hojas. Se empleó como sustrato en las bandejas, solamente material orgánico de pulpa de henequén descompuesta, con las características que se reflejan en el Anexo 2, (Tabla 2 del Anexo 2). La supervivencia de las plántulas se midió a los 15, 30, 45 y 60 días.

El ensayo de supervivencia se repitió en tres oportunidades, al cual se le aplicó un análisis de tabla de contingencia para demostrar la similitud en las características de las poblaciones entre cada una de las repeticiones (142 plántulas promedio por población). El porcentaje de supervivencia por categoría fue comparado a través de la comparación de proporciones.

3.2. Establecimiento de un sustrato que favorezca el proceso de aclimatación de las plántulas de henequén

Se utilizaron plántulas seleccionadas según criterio en epígrafe 3.0 (a), comprendidas en la categoría de 7 a 9 cm de acuerdo con su talla, provenientes de la fase de enraizamiento, a las cuales en todo momento se les aplicó el tratamiento que se explica en el epígrafe 3.0 (b).

Se establecieron mezclas de pulpa de henequén descompuesta con zeolita. Se tuvo en cuenta los indicadores de calidad para sustratos orgánicos que recomienda Paneque (1998), la riqueza del residuo orgánico de la pulpa de henequén se refleja en el Anexo 2 (Tabla 2 del Anexo), ésta se determinó, según la técnica analítica para abonos orgánicos (Paneque *et al.*, 1999).

Los tratamientos en estudio se establecieron a partir de cuatro niveles diferentes de materia orgánica en la mezcla (Tabla 1), expresados en porciento (% MO) y calculados por la metodología de Paneque (1998).

Tabla 1. Tratamientos de estudio para el establecimiento del sustrato (Mezcla equivalente a 10 kg por tratamiento).

Tratamientos	% MO	Densidad (g/cm ³)	Composición volumétrica de las mezclas (%)		Cantidad de los materiales mezclados en kg	
			* Zeolita	** Pulpa de henequén	* Zeolita	** Pulpa de henequén
1	8	0,71	47	53	6,43	3,57
2	10	0,66	38	62	5,54	4,46
3	12	0,62	30	70	4,65	5,35
4	14	0,59	23	77	3,75	6,25

* Zeolita sin cargar, con una densidad de 0,98 g/cm³, granulometría de 1–2 mm (Empresa Geominera del Centro UEB Zeolitas Tasajeras).

** Pulpa de henequén con descomposición de 180 días, de la Empresa Henequenera Eladio Hernández León de Matanzas. Tamizada a 6 mm.

Las condiciones experimentales fueron similares a las descritas en el experimento anterior ($558,74 \leq \text{FFF} \leq 686,55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y $\text{HR} \geq 90 \%$). Para evaluar los resultados se midió el porcentaje de supervivencia de las 40 plántulas a los 15, 30, 45 y 60 días, y el área foliar (Af) y la masa seca total (Ms.T) se determinó a los 60 días. Se utilizó para estos dos últimos indicadores un tamaño de muestra de 10 plantas por tratamiento.

El área foliar se calculó con la ecuación $Af = \text{Largo} \times \text{Ancho} \times 0,68$, de acuerdo con González (2001) y para la determinación de la masa seca total se secaron las muestras en estufa a 80 °C hasta peso constante.

Las longitudes fueron medidas con regla graduada (precisión 1mm) y las masas en balanza analítica Sartorius (precisión 0,1mg).

En la evaluación de los porcentajes de supervivencia por tratamiento se aplicó la prueba de comparación de proporciones, y para la comparación de las medias del Af y Ms.T, se utilizó la estimación de las medias a través del intervalo de confianza para el 95 % de confiabilidad.

Tabla 2. Composición química de los sustratos de acuerdo con los tratamientos establecidos.

Tratamientos	MO	K	Ca	Mg	P	N
	%	%	%	%	%	%
1	8	0,010	0,53	0,092	0,02	0,46
2	10	0,013	0,66	0,115	0,031	0,57
3	12	0,016	0,79	0,139	0,037	0,69
4	14	0,018	0,93	0,162	0,043	0,81

El pH no varió, se mantuvo alrededor de ocho para todas las mezclas. Se obtuvieron con la técnica analítica para abonos orgánicos (Paneque *et al.*, 1999).

3.3. Estudio del comportamiento de plántulas de henequén bajo diferentes condiciones de sustrato y marco de plantación en la fase de previvero

Plántulas con talla de 7 a 9 cm, que fueron aclimatizadas en un sustrato con 10 % MO (pulpa de henequén + zeolita) durante 60 días en condiciones ambientales similares a las descritas en los experimentos anteriores (experimentos 3.1 y 3.2), fueron evaluadas en diferentes tratamientos, teniendo en cuenta el efecto de dos factores: tipo de sustrato y marco de plantación (Tabla 3). Se tomaron como base las recomendaciones del Instructivo Técnico del cultivo del henequén (Cuba MINAG, 1986). Se midieron tres indicadores relacionados con el vigor de las plántulas: Talla, Número de hojas y Grosor del pseudo tallo (Otero, 1999; Enríquez *et al.*, 2000). La medida de los indicadores talla y número de hojas se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el experimento 3.1, el grosor del pseudotallo se midió en la base de éste (punto de inserción con las raíces), para lo cual se utilizó un pie de rey (precisión 1mm).

Se empleó un diseño totalmente aleatorizado con arreglo bifactorial, con un total de seis tratamientos y tres repeticiones por tratamiento; en cada unidad

experimental se utilizó un total de 40 plántulas (120 plántulas/ tratamiento). El experimento se estableció a partir de Junio del 2000 y se muestreó a los 180 días.

Tabla 3. Alternativas de estudio a partir de los factores evaluados.

Tipo de Previvero	Sustrato	Marco de plantación (cm)	
		10 x 10	15 x 15
Cantero de hormigón	P. henequén descompuesta	T ₁	T ₂
	P. henequén descompuesta + suelo. (10 % MO)	T ₃	T ₄
	Suelo sólo	T ₅	T ₆

Suelo: Ferralítico Rojo (Anexo 3)

T₁, T₂, T₃, T₄, T₅ y T₆: tratamientos independientes (3 repeticiones/ tratamiento)

P. henequén (residuo orgánico de pulpa de henequén descompuesta), la riqueza del residuo orgánico de la pulpa de henequén se refleja en el Anexo 2.

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

Las principales variables climáticas que caracterizaron el período experimental se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Principales variables climáticas que caracterizaron el período del previvero.

Período	Temperatura (° C)			Precipitaciones (mm)	Humedad Relativa (%)
	X	Máxima	Mínima		
Junio	23,7	32,7	14,9	45,9	76,5
Julio	25,6	34,5	19,2	86,1	76,1
Agosto	26,9	34,9	21,1	195,5	83,7
Septiembre	26,5	34,3	21,4	306,1	84,8
Octubre	25,4	32,8	16,0	516,9	84,6
Noviembre	22,4	31,3	14,3	225,9	80,5
Diciembre	21,5	31,0	14,4	10,0	78,3

3.4. Efecto del incremento del flujo de fotones fotosintéticos (FFF) y la reducción de la humedad relativa (HR) sobre la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización

Se emplearon plántulas seleccionadas comprendidas en la categoría de 7 a 9 cm de acuerdo con su talla, provenientes de la fase de enraizamiento de la etapa *in vitro*. Como sustrato se empleó el residuo orgánico de pulpa de henequén descompuesta mezclada con zeolita, con un 10 % de MO y una densidad de 0,66 g/cm³. Las plántulas se expusieron a diferentes condiciones de intensidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) durante la aclimatización, las que se explican en la tabla 5. Los cambios de ambiente se realizaron a los 15 días, fecha que se seleccionó en correspondencia con los resultados de los experimentos previamente analizados (3.1 y 3.2).

Tabla 5. Condiciones ambientales a que se expusieron las plántulas de henequén durante la aclimatización.

	Desde 0 a 15 días	Desde 15 a 60 días
Tratamiento I	HR ≥ 90 % (558,74 ≤ FFF ≤ 686,55 μmol m ⁻² s ⁻¹)	HR ≥ 90 % (558,74 ≤ FFF ≤ 686,55 μmol m ⁻² s ⁻¹)
Tratamiento II	HR ≥ 90 % (558,74 ≤ FFF ≤ 686,55 μmol m ⁻² s ⁻¹)	80 % HR (1 303,37 ≤ FFF ≤ 1 602,04 μmol m ⁻² s ⁻¹)
Tratamiento III	HR ≥ 90 % (558,74 ≤ FFF ≤ 686,55 μmol m ⁻² s ⁻¹)	HR (75 – 79 %) (1 941,42 ≤ FFF ≤ 2 288,57 μmol m ⁻² s ⁻¹)

El ambiente caracterizado por el rango de 75 a 79 % HR y (1 941,42 ≤ FFF ≤ 2 288,57 μmol m⁻² s⁻¹), se logró en exterior.

Se empleó un diseño experimental totalmente aleatorizado, cada tratamiento contó con 40 plántulas (5 repeticiones con 8 plántulas cada una). El análisis del porcentaje de supervivencia se realizó para cada tratamiento a los 60 días.

3.5. Efecto del momento de traslado de las plántulas desde las condiciones de ambiente controlado (aclimatización) a ambiente natural (previvero)

Se utilizaron plántulas seleccionadas según criterio en epígrafe 3.0 (a), comprendidas en la categoría de 7 a 9 cm de acuerdo con su talla. Las bandejas fueron rellenas con un sustrato conformado por la mezcla de la pulpa de henequén descompuesta con zeolita, con un 10 % de MO y una densidad de 0,66 g/cm³.

En el experimento se evaluó el momento de traslado de las plántulas desde la etapa de aclimatización a previvero. Las que se trasladaron a los 30, 45 y 60 días de aclimatización, a partir de dos condiciones de manejo del ambiente en las casas de cultivo, de acuerdo con los resultados del experimento anterior (Experimento 3.4).

Se empleó un diseño experimental completamente aleatorizado con arreglo bifactorial, cada tratamiento contó con 40 plántulas. Los tratamientos quedaron constituidos de la siguiente forma:

Factor I		Factor II		
		Manejo de las condiciones ambientales en la casa de cultivo		Momento de traslado (días)
Condiciones	Desde 15 a 60 días	30	45	60
C1	HR \geq 90 % y (558,74 \leq FFF \leq 686,55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	I	III	V
C2	80 % HR y (1 303,37 \leq FFF \leq 1 602,04 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	II	IV	VI

De 0 a 15 días el manejo de las condiciones ambientales es similar para todos los tratamientos: HR \geq 90 % y (558,74 \leq FFF \leq 686,55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). I, II, III, IV, V y VI constituyen tratamientos independientes.

Las condiciones en el previvero se desarrollaron de acuerdo al epígrafe 3,0 (d), en correspondencia con los resultados del experimento 3.3. El porcentaje de

supervivencia por tratamiento fue procesado a través de la comparación de proporciones.

3.6. Estudio de algunos cambios anatomorfológicos y fisiológicos producidos en las plántulas durante la aclimatización

Se utilizaron plántulas seleccionadas comprendidas en la categoría de 7 a 9 cm de acuerdo con su talla, provenientes de la fase de enraizamiento. El proceso se desarrolló en casa de cultivo bajo condiciones controladas de acuerdo al siguiente manejo: de 0 a 15 días, $HR \geq 90 \%$ y $(558,74 \leq FFF \leq 686,55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$, y de 15 a 60 días, 80% HR y $(1\ 303,37 \leq FFF \leq 1\ 602,04 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1})$. Como sustrato se empleó el residuo orgánico de pulpa de henequén descompuesta mezclada con zeolita, con un 10 % de MO y una densidad de $0,66 \text{ g/cm}^3$.

El comportamiento de diferentes indicadores anatomorfológicos y fisiológicos de las plántulas durante el proceso de aclimatización se evaluó a partir de la salida *in vitro* hasta los 60 días con intervalos de 15 días (0, 15, 30, 45 y 60 días).

Se empleó un diseño experimental totalmente aleatorizado, cada tratamiento contó con 120 plántulas, divididos en tres unidades experimentales de 40 plántulas cada una.

Los tratamientos experimentales quedaron constituidos de la siguiente forma:

- Plantas al momento de salida de las condiciones *in vitro* a las *ex vitro* (0 días).
- Plantas con 15 días en casa de cultivo ($HR \geq 90 \%$ y FFF entre $558,74$ y $686,55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
- Plantas con 30 días en casa de cultivo, de 0 a 15 días ($HR \geq 90 \%$ y FFF entre $558,74$ y $686,55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y 15 días (80% HR y FFF entre $1\ 303,37$ y $1\ 602,04 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
- Plantas con 45 días en casa de cultivo, de 0 a 15 días ($HR \geq 90 \%$ y FFF entre $558,74$ y $686,55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 30 días (80% HR y FFF entre $1\ 303,37$ y $1\ 602,04 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

- Plantas con 60 días en casa de cultivo, de 0 a 15 días (HR \geq 90 % y FFF entre 558,74 y 686,55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 45 días (80 % HR y FFF entre 1 303,37 y 1 602,04 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

En 25 plántulas se midieron: tamaño de la planta (talla), masa fresca de la planta (Mf.P), número de hojas (No hojas), ancho de las hojas (ancho hojas), número de raíces (No Raíces), masa fresca de la raíz (Mf.R) y relación masa fresca de la raíz, masa fresca de la planta (Mf.R/Mf.P). En diez plantas se determinaron: masa seca total (Ms.T), área foliar (Af) e indicadores del estado hídrico de las plantas, contenido relativo de agua (CRA) y potencial hídrico foliar (Ψ_h). En cinco plántulas se determinó la masa seca de los distintos órganos de la planta: masa seca del sistema radical (Ms.R), masa seca del tallo (Ms.Ta) y masa seca foliar (Ms.H). A partir de estas variables de biomasa se determinaron además, la tasa absoluta de crecimiento (TAC), la tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de asimilación neta (TAN), la relación de peso foliar (RPF), el área foliar específica (AFE) y la relación del área foliar (RAF). También se caracterizó el tejido epidérmico y del mesófilo de la hoja (estas técnicas se describen más adelante).

La tasa absoluta de crecimiento se calculó según la siguiente ecuación propuesta por Torres (1985):

- $TAC = (m_2 - m_1) / (t_2 - t_1)$

Las tasas relativas se calcularon de acuerdo a las siguientes expresiones matemáticas (Beadle, 1993):

- $TRC = (\ln m_2 / m_1) / (t_2 - t_1)$, siendo m_1 y m_2 , y t_1 y t_2 las masas secas y los tiempos, al inicio y final del período considerado respectivamente.
- $TAN = [(m_2 - m_1) / (A_2 - A_1)] [(\ln A_2 / A_1) / (t_2 - t_1)]$, siendo A_2 y A_1 la superficie total foliar inicial y final respectivamente.
- $RPF = [(m_{h2} - m_{h1}) / (m_2 - m_1)] [(\ln m_2 / m_1) / (\ln m_{h2} / m_{h1})]$, donde m_{h1} y m_{h2} son las masas secas foliares al inicio y al final del período considerado.
- $AFE = [(A_2 - A_1) / (m_{h2} - m_{h1})] [(\ln m_{h2} / m_{h1}) / (\ln A_2 / A_1)]$.

- $RAF = [(A_2 - A_1) / (m_2 - m_1)] [(\ln m_2 / m_1) / (\ln A_2 / A_1)]$. Este último parámetro corresponde al producto de otros dos parámetros ($RAF = RPF \times AFE$).

Las variables Mf.P, No hojas, ancho hojas, No Raíces, Mf.R y Mf.R/Mf.P, Af, Ms.R, Ms.Ta y Ms.H se determinaron según los procedimientos que se explican en los experimentos 3.1 y 3.2.

El contenido relativo de agua foliar (CRA), se determinó según Barrs (1968) y Sánchez-Díaz y Aguirreolea (2000), a partir de la siguiente expresión: $[(m_f - m_s) / (m_t - m_s)] \times 100$, donde m_f es la masa fresca, m_s es la masa seca y m_t es la masa turgente.

La masa fresca corresponde a la masa foliar en el momento del muestreo, la masa turgente es la masa de las hojas tras su saturación en agua a 4°C durante 24 horas en la oscuridad, y la masa seca es la masa de las hojas tras colocarlas en estufa a 80 °C hasta peso constante.

La medida del potencial hídrico foliar antes del alba (Ψ_h), fue realizada antes del final del período de oscuridad (al alba), en el mismo tipo de hoja de cada plántula por tratamiento. Para la determinación del mismo se utilizó una cámara de presión tipo Scholander- Hammer, de acuerdo con la técnica seguida por Scholander *et al.* (1964 y 1965).

Los tratamientos con 30; 45 y 60 días en aclimatización tuvieron un seguimiento en condiciones de previvero, a partir del mes de mayo (2003). Las plántulas fueron trasplantadas a las condiciones de sustrato y marco de plantación de acuerdo con los resultados del experimento 3.3. En el previvero se evaluó la talla, el número de hojas, el área foliar y la biomasa total, y se calcularon los indicadores del crecimiento: tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de asimilación neta (TAN) y la relación del área foliar (RAF). Las mediciones se hicieron al inicio del previvero (coincide con la evaluación hecha al final de la aclimatización para cada uno de los tratamientos) y al final del previvero, (180 días), período en que la talla es igual o

superior a 15 cm y el número de hojas de seis hojas o más para cada uno de los tratamientos. En esta fase el tamaño de muestra fue de 10 plantas para todas las variables e indicadores evaluados.

Para la caracterización histológica del tejido epidérmico y del mesófilo de la hoja, las secciones de tejidos utilizadas fueron procesadas con las técnicas convencionales para microscopía óptica. En todos los casos las muestras se obtuvieron de la hoja +1 (hoja más joven, completamente extendida, contando a partir del ápice meristemático).

En el estudio del tejido epidérmico las hojas seleccionadas fueron separadas de las plántulas y colocadas en una solución fijadora de formaldehído (solución F.A.A.) entre 24 y 72 horas, con el objetivo de mantener las estructuras lo más similar posible a las que tenían en condiciones normales, posteriormente fueron sometidas a un proceso de deshidratación y conservación en etanol al 70 % donde estuvieron sumergidas hasta ser analizadas.

Finalmente para la obtención de la epidermis, en cada una de las muestras se seleccionó la zona media de la lámina de la hoja y con una cuchilla de afeitar se realizó la técnica del raspado.

Las muestras de los tejidos epidérmicos se tiñeron con una solución de Safranina O al 1 %, se colocó una gota encima de la epidermis durante un minuto y luego se lavaron con agua destilada. Se montaron con glicerina, y se observaron y fotografiaron en un microscopio óptico de campo claro.

Los tejidos de la lámina fueron seccionados en pequeños trozos de 2 mm, obtenidos de la zona media de la lámina de la hoja y colocados en el fijador (Paraformaldehído al 4 %), los cuales se sometieron a condiciones de vacío de 3 a 5 minutos, para ayudar a la penetración del fijador dentro de la muestra, posteriormente se mantienen con el fijador durante 18 a 24 horas a una temperatura de 4 °C, después se lavaron las muestras en tampón PBS (Buffer Fosfato Salino), realizándoseles tres cambios de 10 minutos cada uno.

Las muestras fijadas se deshidrataron en etanol, y finalmente fueron incluidas en resina Epón. Los cortes semifinos de 1 μm de espesor se tiñeron con Safranina O al 1 % y se montaron en euquit. Fueron fotografiados con una cámara digital Olympus, acoplada al microscopio.

En el análisis de las variables Mf.P, No hojas, ancho hojas, No Raíces, Mf.R, Mf.R/Mf.P, Ms.T, Af, CRA y Ψ_h , se aplicó la prueba de análisis discriminante con el objetivo de tratar de describir a partir de los ejes discriminantes, las diferencias que puedan existir entre los tratamientos o grupos de plantas, así como reflejar las variables que mayor aporte hacen a esta diferenciación. Los grupos de plantas señalados, se corresponden con los tratamientos evaluados de la siguiente forma: grupo I (salida *in vitro*); grupo II (15 días); grupo III (30 días); grupo IV (45 días) y grupo V (60 días). Los días se refieren a días en el proceso de aclimatización o casa de cultivo. Se representó gráficamente como se agrupan espacialmente los individuos estudiados.

Para el procesamiento de los indicadores del crecimiento (TRC, TAN, RAF, RPF, AFE); Ms.T, Af, CRA y Ψ_h se aplicó un análisis de varianza de clasificación simple con un 95 % de nivel de significación y la prueba de rangos múltiples de Duncan para la comparación de las medias. En las variables No hojas y No Raíces se aplicó la prueba de Kruskal – Wallis.

En el anexo 4 aparece el esquema general del experimento.

3.7. Estudio del comportamiento de plántulas de henequén en condiciones de previvero, en diferentes fechas de plantación

Las plántulas se establecieron en el previvero en tres meses diferentes del año, enmarcados en el período 2002 - 2003. Se evaluó el efecto de las épocas estacionales de acuerdo con las condiciones climáticas de Cuba en el crecimiento y desarrollo de las mismas. Cada una de estas fechas constituyó un tratamiento en estudio (Tabla 6).

Tabla 6. Tratamientos de estudio de acuerdo con las fechas de plantación establecidas.

Tratamientos	Fecha del trasplante en el pre vivero	Final del período (180 días)
1	mayo 2002	Noviembre 2002
2	Julio 2002	Enero 2003
3	Enero 2003	Julio 2003

En cada variante evaluada se establecieron en previvero, en las condiciones que se detallan en el epígrafe 3.0. (d), 40 plántulas con 30 días de estancia en la fase de aclimatización, de acuerdo con los resultados y las condiciones que se describen en el experimento anterior (Experimento 3.6). En el montaje de cada una de las etapas se emplearon el sustrato y marco de plantación resultados del experimento 3.3. Durante el período experimental se tomó información de la temperatura y humedad relativa, como principales variables climáticas de interés para el estudio, ya que el experimento se condujo bajo riego.

Para la evaluación de los resultados se midió el comportamiento de tres indicadores relacionados con el crecimiento y desarrollo de las plántulas, en este caso: Talla, Número de Hojas (No hojas) y Área Foliar. Los muestreos se hicieron a los 180 días de estancia en estas condiciones.

En el procesamiento de los resultados se compararon los valores medios alcanzados al final de la etapa (180 días) para cada uno de los indicadores medidos, a través de los intervalos de confianza de las medias con un 95 % de confiabilidad.

3. 8. Valoración económica

Para la realización de este análisis el proceso se dividió en dos momentos: 1^{ero}, se evaluó comparativamente el comportamiento de los gastos incurridos en la etapa de aclimatización, teniendo como condición tres períodos diferentes en que se establecieron las plántulas en esta fase (30, 45 y 60 días), para lo cual se tomó

como base la producción de 500 000 plantas. De esta manera se estableció una ficha de costo de todo el proceso teniendo en cuenta los recursos empleados (Anexo 5). A partir de esta ficha se calcularon los siguientes indicadores:

Ganancia = Ingreso – Costos

Costo unitario = Costo/planta

Relación beneficio/costo = Ganancia/Costo

Rentabilidad = Beneficio/costo x 100 (Weston, 2000; Gitman, 2001)

En el 2^{do}, se evaluó comparativamente el costo medio de permanencia de la postura en vivero por el método tradicional y el costo medio de permanencia de la postura obtenida de la micropropagación, en previvero y vivero. En este análisis se tuvo en cuenta la información aportada por el departamento de economía de la Empresa Henequenera de Matanzas (Eladio Hernández León). Los datos aportados se obtuvieron tomando como base las indicaciones que establece la Resolución Conjunta No 1 entre el Ministerio de Economía y Planificación y el Ministerio de Finanzas y Precios, del 2005.

3.9. Análisis estadísticos

En todos los tratamientos estadísticos se empleó el programa STATGRAPHICS plus versión 5.0. En cada análisis que se aplicó los métodos paramétricos, se comprobó que la distribución de la población se ajustaba a una distribución normal, aplicando la prueba de Kolmogorov- Smirnov y que cumplían además con la prueba de homogeneidad de la varianza aplicando la prueba de Bartlett.

Se aplicaron los modelos lineales (ANOVA de clasificación simple); prueba de rangos múltiples de Duncan para la discriminación de las medias, con un 5 % de significación; análisis de los intervalos de confianza de las medias con un 95 % de confiabilidad; análisis de distribución de frecuencia; tabla de contingencia; análisis discriminante y la prueba de comparación de proporciones para los casos de porcentajes de supervivencias.

En algunos casos de variables discretas, que no cumplían con la distribución normal, se aplicó la prueba de Kruskal – Wallis.

Durante la ejecución del proceso de investigación se realizaron varios experimentos clasificados como monofactoriales y bifactoriales. El diseño experimental que más se ajustó a los diseños de investigación empleados fue el totalmente aleatorizado, donde se cumplió con el principio de la diferencia única.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la calidad de las plántulas en la supervivencia, en el momento de salida de las condiciones *in vitro* a las *ex vitro*

En la figura 1 se muestra que el tamaño de las plántulas osciló de forma similar en los tres grupos entre valores muy cercanos a los 2 cm y hasta los 12 aproximadamente, no obstante las clases más representativas se ubican entre 4 y 10 cm, siendo la frecuencia de aparición de individuos fuera de estos valores muy poco representativa de las poblaciones. Esto indica que el manejo de las plántulas de henequén en las condiciones *in vitro* de acuerdo al protocolo establecido por González (2001) conduce a obtener en mayor medida plántulas en este intervalo de talla.

Sin embargo, las variaciones en el tamaño de las plántulas puede inducir comportamientos diferentes durante la etapa de aclimatización, debido a la influencia de la talla y masa fresca en este proceso, ello fue informado por Ortiz *et al.* (1998b); Yanes *et al.* (2000) y Rodríguez (2005) en otros cultivos, por lo tanto se sugiere la importancia de evaluar el desarrollo de las diferentes clases o categorías de las plántulas de henequén durante esta fase.

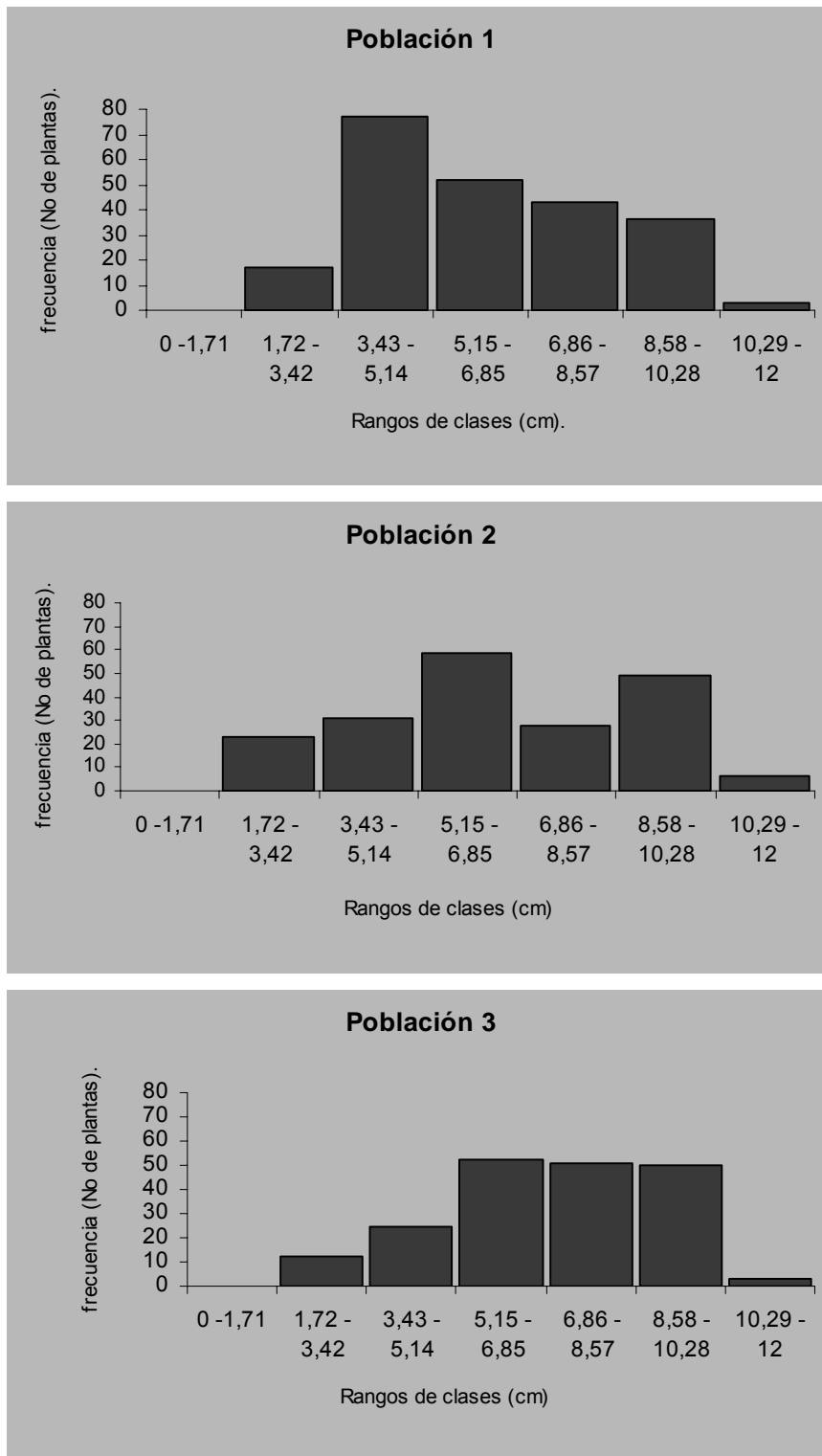


Figura 1. Histogramas de distribución de frecuencia por clases para la variable tamaño de plántula, en tres poblaciones diferentes, en el momento de su salida de *in vitro*.

De acuerdo con los resultados que se muestran (Figura 1), evaluar las plántulas menores de 2 cm y mayores de 10, como categorías individuales de planta no reportaría ningún resultado de interés particular para el estudio por el reducido número de individuos en estos grupos. Por ello el número de clases se reconsideró y se establecieron nuevos límites de los intervalos, donde quedaron insertados estos grupos anteriores, lo que permitió evaluar todos los individuos de las poblaciones.

En correspondencia con este análisis, en la tabla 7 se refleja el comportamiento promedio de la frecuencia relativa y la frecuencia relativa acumulada de las tres poblaciones, de acuerdo con los intervalos mostrados en la figura 1. Las plántulas menores o iguales a 3,42 cm solamente representan aproximadamente el 8 % de los individuos de las poblaciones en estudio, sin embargo, si se considera el límite de 5,14 cm la frecuencia relativa acumulada puede representar prácticamente el 30 % de los individuos de estas poblaciones, lo que puede ser un primer límite de clase a considerar para el estudio. De igual manera la frecuencia de aparición de individuos superiores al límite de 10,28 cm representa solamente el 1,9 % de las plántulas de las poblaciones analizadas. Si se toman las plántulas mayores de 8,57 cm la frecuencia relativa es superior al 20 %, lo que permite establecer la categoría superior de las plántulas a partir de esta talla.

Tabla 7. Comportamiento de la frecuencia relativa y la frecuencia relativa acumulada de acuerdo con las clases establecidas para las tres poblaciones en estudio.

Límite Inferior (cm)	Límite Superior (cm)	Frecuencia Relativa	Frecuencia Relativa Acumulada
0	1,71	0	0
1,72	3,42	0,083	0,083
3,43	5,14	0,208	0,291
5,15	6,85	0,266	0,557
6,86	8,57	0,198	0,755
8,58	10,28	0,222	0,977
10,29	12	0,0193	100

Los valores reflejados de Frecuencia Relativa y Frecuencia Relativa Acumulada representan el valor promedio de las tres poblaciones en estudio para cada una de las clases.

A partir del análisis anterior se puede asumir que para las plántulas de henequén, la categoría más pequeña a establecer debe tener como límite superior una talla de 5,14 cm y como categoría de mayor tamaño, individuos con tallas superiores a 8,57 cm, pudiendo prefijarse estos límites en 5 y 9 cm para darle una mayor utilidad práctica. En este rango deben quedar establecidas además dos categorías intermedias, que pueden ser de 5 a 6,9 cm y de 7 a 9 cm, representando aproximadamente un 26 y un 20 % respectivamente de los individuos de las poblaciones a establecer en las casa de cultivo para su aclimatización.

Asumir cuatro clases o categorías es suficiente para establecer criterios en cuanto al comportamiento de las plántulas de henequén y el manejo de éstas durante la fase *ex vitro*. En tal sentido las nuevas clases o categorías que se establecen para evaluar el efecto del tamaño de las plántulas en la supervivencia son: I (<5 cm), II (5 -6,9 cm), III (7-9 cm) y IV (>9 cm).

En la tabla 8 se reflejan los valores de dos indicadores de calidad de las plántulas al momento de la salida de *in vitro* (Masa fresca y Número de hojas) de acuerdo con las categorías establecidas, así como el porcentaje que representa el total de plántulas por categoría dentro de la población.

Tabla 8. Comportamiento de la masa fresca y el número de hojas de las plántulas de henequén al momento de la salida *in vitro* de acuerdo con las categorías establecidas, así como el porcentaje del total plántulas por categoría dentro de la población.

Categorías	Porcentaje que representan	Indicadores	
		Masa fresca (g)	Número de hojas
I (<5 cm)	21,31	0,24 ± 0,05	2,9 ± 0,3
II (5 - 6,9 cm)	30,91	0,42 ± 0,07	3,9 ± 0,4
III (7- 9 cm)	27,40	0,89 ± 0,1	4,8 ± 0,4
IV (>9 cm)	20,37	1,68 ± 0,18	5,8 ± 0,5

±(Intervalo de confianza de la media)

Las categorías fueron comparadas a través del intervalo de confianza de la media, para el 95 % de confiabilidad. n = 30.

En la figura 2 se aprecia el porcentaje de supervivencia de las plántulas durante la fase de aclimatización de acuerdo con las categorías establecidas.

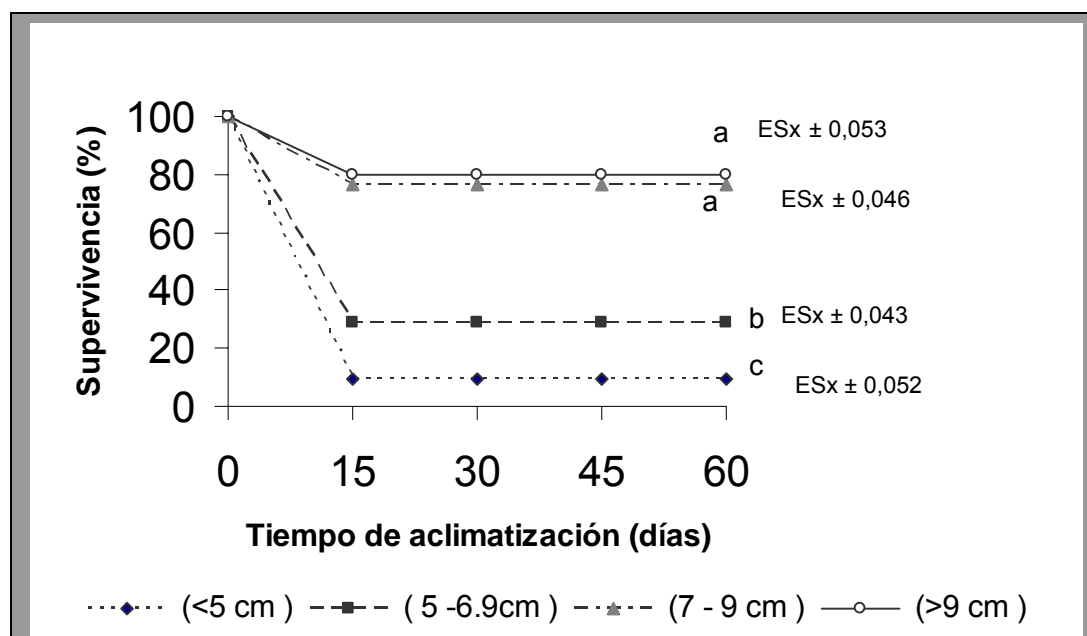
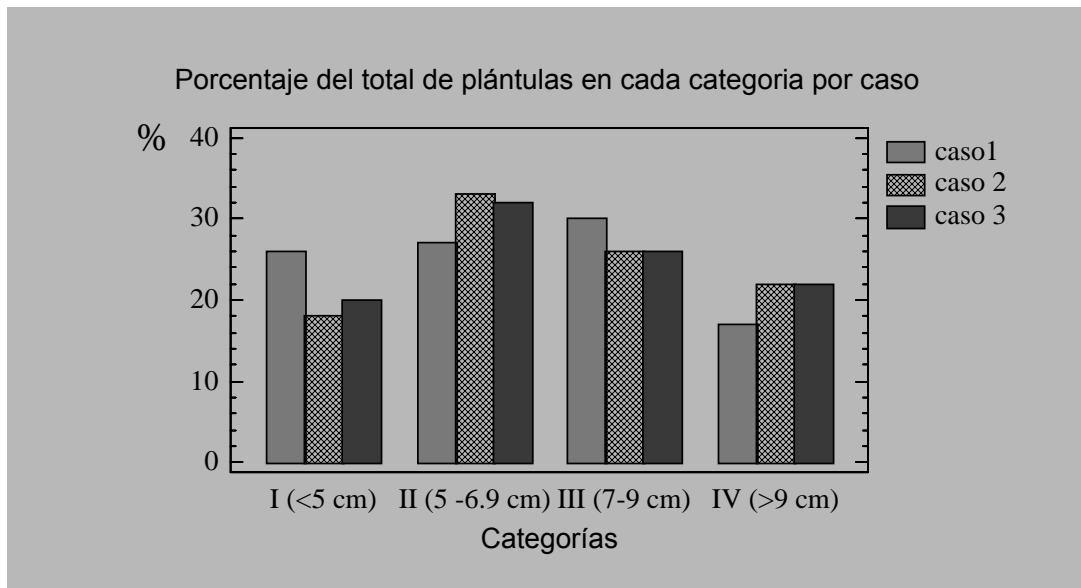
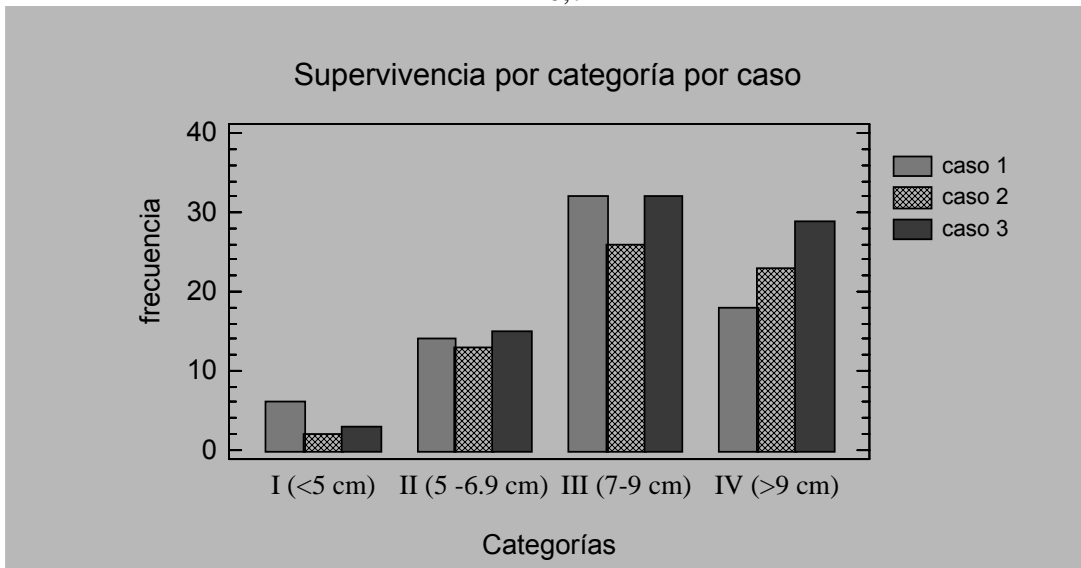


Figura 2. Efecto de la calidad de las plántulas de henequén en el momento de la salida de las condiciones *in vitro* sobre la supervivencia de las mismas durante la aclimatización, establecidas sobre sustrato orgánico (pulpa de henequén descompuesta).

Para arribar a estos resultados se realizó inicialmente un análisis de contingencia a través de la Prueba de Chi- Cuadrado, con el objetivo de evaluar la independencia entre el momento en que se estableció cada ensayo y el comportamiento de las poblaciones (Figura 3).



P = 0,74



P = 0,63

Figura 3. Comportamiento de las categorías de plántulas en tres poblaciones independientes (casos), teniendo en cuenta el porcentaje del total de plántulas en cada categoría por población, al momento de su salida de *in vitro* y la supervivencia de las plántulas por categoría para cada una de las poblaciones durante la aclimatización.

En los dos análisis reflejados en la figura 3 el valor de P es superior a 0,1, mostrando que la supervivencia y el porcentaje que representa el total de plántulas por categoría en cada población evaluada fueron similares e independientes del momento en que se realizó el ensayo. Con ello se corroboran además los resultados del análisis de distribución de frecuencia del tamaño de las plántulas, en cuanto al porcentaje que representa el total de plántulas por categoría al momento de su salida *in vitro*.

En los resultados mostrados en la figura 2 y la tabla 8, se aprecia que hubo un efecto significativo del tamaño y la masa fresca en los índices de supervivencia de las plántulas de henequén. En las categorías III y IV, representadas por las plántulas de mayor talla y mayores contenidos en masa fresca, se alcanzaron los niveles más elevados de supervivencia (76,92 y 80,45 %, respectivamente), en las condiciones de desarrollo creadas hasta ese momento (sustrato 100 % orgánico), que difiere significativamente de las plántulas de las categorías I y II, las cuales mostraron porcentajes de 12 y 31,8 %, respectivamente. Este resultado refleja que la supervivencia de las plántulas en estas categorías disminuyó en más de un 50 %. Este hecho sugiere que las plantas de mayor talla presentaron mayor cantidad de biomasa durante la fase *in vitro*, que las condicionó positivamente para sobrevivir al estrés provocado por el cambio a las condiciones *ex vitro*.

El éxito de la aclimatización depende de que las plantas puedan pasar de condiciones heterotróficas o mixotróficas (mezcla de autotróficas con heterotróficas) al autotrofismo, proceso que obedece en gran medida a las reservas adquiridas por las plántulas durante la fase *in vitro* (Kozait *et al.*, 1991; Pospisilova *et al.*, 1999 y 2000; Aragón *et al.*, 2006). La biomasa acumulada por las plántulas durante esta fase, se ha utilizado como indicador por diferentes autores (Ortiz *et al.*, 1998b; Yanes *et al.*, 2000; Rodríguez, 2005) para establecer criterios de calidad de las plántulas a partir de la clasificación en diferentes categorías (grandes, medianas y pequeñas), esto ha permitido establecer manejos de las plántulas durante el proceso de aclimatización o desde las condiciones *in*

vitro, de manera que se pueda obtener mayor eficiencia del proceso de micropropagación.

Para la aclimatización de plántulas de caña de azúcar, plátano, papa y piña, Ortiz *et al.* (1998b), Yanes *et al.* (2000) y Rodríguez (2005) destacan la influencia de la talla y la masa fresca en la supervivencia de las mismas. Estos autores consideraron tres categorías (grandes, medianas y pequeñas), las cuales no coinciden en los rangos de valores que representan a cada una de ellas en los diferentes cultivos, pues estos están muy influenciados por la especie y por la metodología de propagación que se utilice.

De los análisis realizados se evidencia la importancia de la clasificación de las plántulas de henequén en diferentes categorías para lograr mayor efectividad en el proceso *ex vitro*. También se demostró la influencia de la talla y masa fresca en los porcentajes de supervivencia en la aclimatización. Según Rodríguez (2005) y Aragón *et al.* (2006), en esta fase, en la medida que se incrementa la masa fresca en las plántulas, pudieran estar presente mayores reservas que metabólicamente se emplean hasta que estas emitan el nuevo follaje y el sistema radical que les permite establecer un desarrollo autotrófico.

Además, los resultados alcanzados en este experimento sugieren la necesidad de establecer las características patrones que deben poseer las plántulas de henequén para entrar en la fase de aclimatización. Ello con relación a lo informado por Rodríguez (2005) y Martínez *et al.* (2005), garantiza un mayor éxito en la supervivencia y desarrollo de las mismas.

Los desórdenes fisiológicos de las plantas micropropagadas, consecuencia del cultivo *in vitro*, señalado por Debergh y Zimmerman (1991), Robert *et al.* (1992) y Pospíšilová *et al.* (1997 y 1999), unido a las peculiaridades en la fisiología de esta especie (Cushman, 2001 y Luttge, 2004), pudieran ser la causa de que las plántulas de henequén sean muy vulnerables durante las primeras semanas de la aclimatización (Figura 2), si no se utiliza un material con suficientes reservas

nutricionales para soportar el estrés del trasplante y el cambio a un metabolismo autotrófico.

Este hecho pudiera explicar la particularidad de que los niveles de supervivencia más favorables encontrados en las plántulas de henequén, se ubiquen en un rango de talla igual o mayor a 7cm y masa fresca superior a 0,42 g, muy diferente al comportamiento de las plántulas de los cultivos mencionados en los párrafos anteriores (caña de azúcar, plátano, papa y piña).

Otro aspecto muy importante que se debe destacar, es que el índice de supervivencia se estabilizó en esta especie a partir de los 15 días de la aclimatización (Figura 2), lo que evidencia una alta correspondencia con la capacidad de las plántulas para emitir las nuevas raíces verdaderas. Según lo informado por Izquierdo *et al.* (2002), esta respuesta morfogénica permite corregir la dificultad en la absorción y circulación de agua, debido a una conexión vascular incompleta o deficiente entre la raíz y el brote, como es característico de las raíces producidas *in vitro* (Debergh y Mene, 1981; Ruscitti *et al.*, 2002). En este experimento, aunque no se cuantificó la presencia o no de raíces verdaderas, sí se corroboró que las plántulas que no sobrevivieron al trasplante, no fueron capaces de emitir nuevas raíces durante este período (15 ± 5 días), esta respuesta negativa pudo aumentar la susceptibilidad de las plántulas, lo que sugiere entre otras posibles causas, que estas mueran cuando se les acaba sus reservas nutricionales.

En la supervivencia de las plántulas de henequén (Figura 2), además de la influencia del tamaño y la masa fresca, pudiera influir el efecto del sustrato empleado, en este caso, compuesto íntegramente por pulpa de henequén descompuesta.

Los resultados de este ensayo demostraron que con el protocolo de micropropagación que establece González (2001), las plántulas de henequén menores de siete centímetros, representan algo más del 50 % de las poblaciones

en estudio (Tabla 8), lo que influye negativamente en el proceso de aclimatización de esta especie, ya que se produce una elevada mortalidad en estas plántulas.

Esto indica la necesidad de realizar cambios en el esquema de micropropagación, que proporcione plántulas con la calidad requerida para sobrevivir bajo condiciones *ex vitro* y que garantice un protocolo eficiente de producción de plántulas de henequén, de manera que el tamaño de las plántulas para entrar en la fase de enraizamiento se estandarice entre 5 y 6 cm de talla. Esto permitirá alcanzar los patrones de crecimiento necesarios durante este tiempo (talla mayor o igual a 7 cm y masa fresca de 0,42 g como mínimo), para pasar a la etapa de aclimatización y garantizar una mayor eficiencia de todo el proceso.

Aunque la supervivencia de las plántulas en las categorías III y IV no se diferenciaron y fueron superiores a las restantes, las plántulas de la categoría III (7-9 cm) fueron las seleccionadas para realizar los experimentos posteriores, por representar la categoría con mayor número plántulas con un comportamiento favorable.

4.2. Establecimiento de un sustrato que favorezca el proceso de aclimatización de las plántulas de henequén

Los resultados reflejados en las figuras 4 y 5 muestran el efecto del manejo de este factor en la supervivencia de las plántulas de henequén y en los indicadores del desarrollo evaluados.

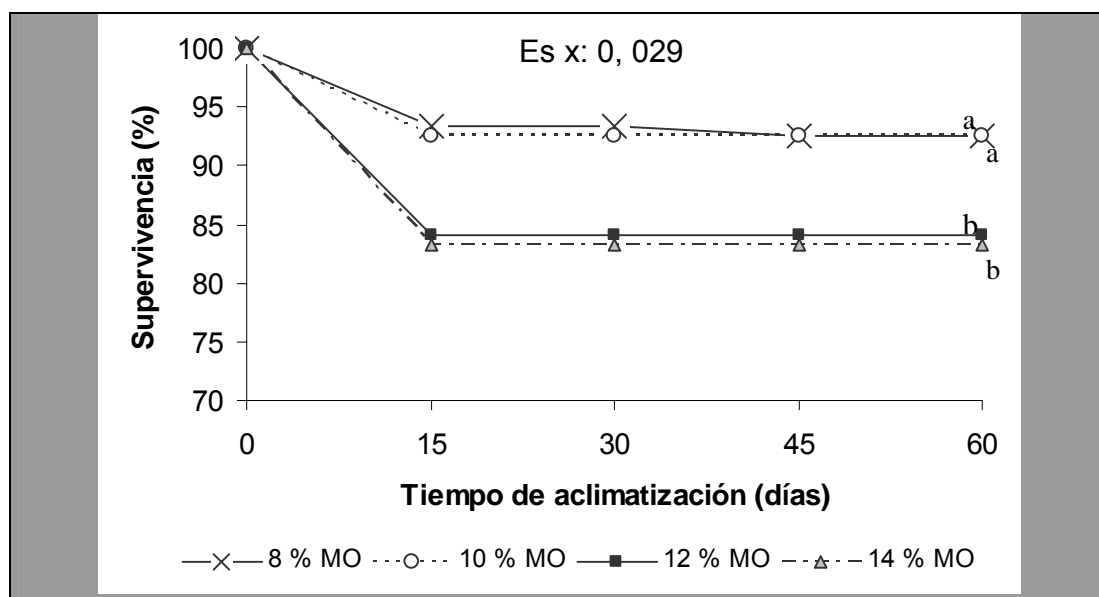


Figura 4. Efecto de las condiciones del sustrato en la supervivencia de las plántulas de henequén durante la aclimatación.

Como se puede apreciar en la figura 4, en todos los tratamientos en estudio, los porcentajes de supervivencia alcanzaron valores superiores al 80% a los 60 días de la aclimatación. La mayor supervivencia, por encima de un 90%, correspondió a las combinaciones de 8 y 10% de MO, que difieren significativamente de las restantes. Sin embargo, en estos resultados se observa que hubo un comportamiento muy parecido al mostrado en la figura 2, en cuanto a la dinámica de supervivencia en el tiempo, en este caso se refleja, al igual que en el caso anterior, que en todos los tratamientos evaluados la supervivencia de las plantas se estabilizó a partir de los 15 días, lo que corrobora los análisis hechos en cuanto a las particularidades de esta especie y su influencia en el comportamiento de las plántulas durante la aclimatación.

En los resultados de este ensayo se observa que se producen porcentajes de supervivencia superiores, en comparación a cuando se empleó solo material orgánico en el sustrato (Experimento 4.1). A pesar de ser ensayos diferentes, ello sugiere que las mezclas de material orgánico e inorgánico favorecen la aclimatación de plántulas de henequén, aún cuando el comportamiento en las

mezclas se presentó con resultados más favorables en las cantidades más bajas de materia orgánica (8 y 10 % MO).

Los menores porcentajes de supervivencia en los tratamientos con 12 y 14% de MO, pudieran explicarse por la mayor presencia del material orgánico en la mezcla, que por una parte puede influir de manera negativa en la relación macroporo/ microporo presente en el sustrato, lo que puede limitar el intercambio gaseoso en la zona de las raíces, e inhibir la diferenciación de la zona meristemática con retraso en la emisión de nuevas raíces, y por otra, una disminución en el índice de permeabilidad de los sustratos como consecuencia de las mayores proporciones de materia orgánica, que asociados a los más altos niveles de humedad en el ambiente de la instalación, provocan mal drenaje de los mismos y favorecen los procesos de pudrición y la muerte prematura de las plántulas. Situación parecida a la que se encontró en el experimento anterior, cuando se utilizó la pulpa de henequén como sustrato orgánico individual, con un 22,4 % de MO, pero en este caso en menor escala.

Según destaca Rodríguez (2005) el porcentaje de supervivencia en la aclimatización de las plántulas de caña de azúcar, se afecta significativamente cuando solo se emplea como sustrato materia orgánica (compost), pues las altas concentraciones de la misma en el sustrato, provoca que exista baja porosidad y baja permeabilidad, además que las frecuentes nebulizaciones necesarias para lograr elevados niveles de humedad relativa durante la primera etapa del proceso de aclimatización, provocan mal drenaje e ineficiente intercambio gaseoso, al tiempo que propicia la aparición de enfermedades que afectan la supervivencia de las plántulas en los primeros 14 días.

Por todo lo antes expuesto, se confirmó que solo el uso del material orgánico no permite alcanzar altos porcentajes de supervivencia, además también se ha informado que sustratos ricos en materiales inorgánicos (perlita más del 50 %) pueden provocar efectos indeseados, como son: baja disponibilidad de agua en el sustrato, mala cohesión entre las partículas y las raíces y menor crecimiento de las plántulas (Favaro *et al.*, 2002). Por ello las mezclas se emplean para combinar

sus ventajas y minimizar los aspectos negativos que retrasan el crecimiento y desarrollo de las plántulas en el proceso de aclimatización.

En correspondencia con el criterio del uso de la zeolita, Ortiz *et al.* (1998a), encontraron mayores niveles de supervivencia en plántulas de caña de azúcar, cuando utilizaron un sustrato constituido por la mezcla de cachaza y litonita (zeolita enriquecida con nutrientes), comparado con sustratos orgánicos individuales (cachaza, humus, compost y turba). También durante la aclimatización de plántulas de papa y plátano, Ortiz (1999) informa los mejores resultados en la supervivencia y en el comportamiento de diferentes variables morfológicas evaluadas, cuando el sustrato está constituido por un producto orgánico mezclado con un porcentaje de zeolita.

En la figura 5 se refleja el comportamiento de los indicadores área foliar y masa seca total. En ambos casos la combinación de 10 % de MO superó significativamente a la combinación de 8 %, sin embargo no difirió de las combinaciones de 12 y 14 % de MO. Además, se aprecia que estas últimas combinaciones (12 y 14% de MO), no difieren entre ellas, pero tampoco éstas difirieron de las de 8 % MO.

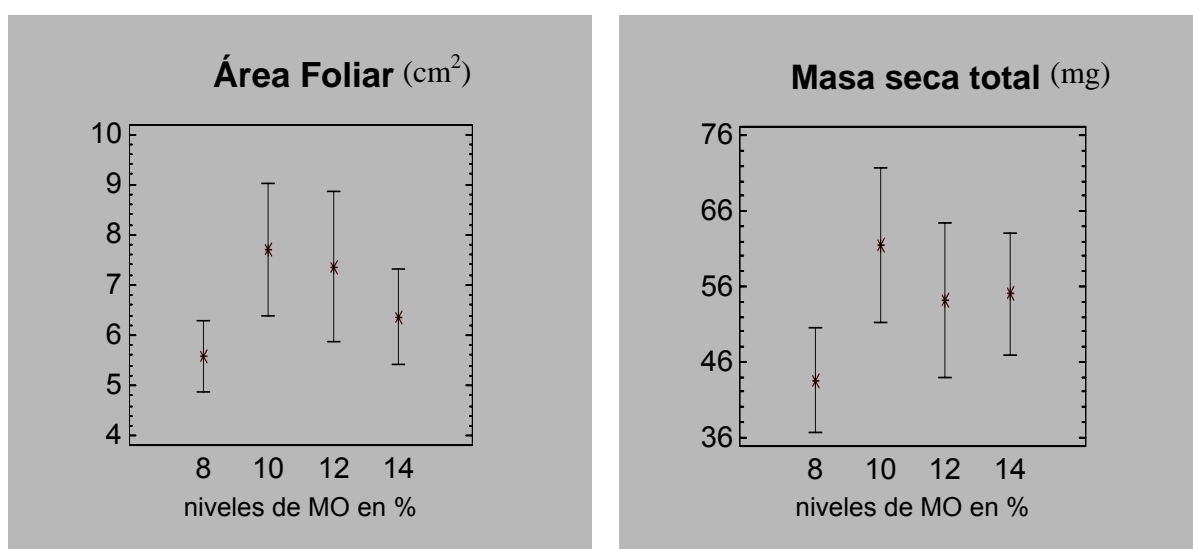


Figura 5. Intervalos de confianza de las medias para el área foliar y la masa seca total, con un 95 % de confiabilidad. Cada valor representa la media para $n = 10$.

Tanto el área foliar como la masa seca se presentaron con un comportamiento similar, pues los mejores resultados se alcanzaron en la mezcla del 10 % de MO, e incrementos superiores a este porcentaje de materia orgánica en el sustrato no produjo incrementos en el crecimiento de las plántulas de henequén, aunque tampoco se produjeron decrementos. Ello evidencia que en la segunda mezcla (10 % MO) se logró una proporción correcta entre los materiales, que permitió una composición química y física equilibrada y uniforme en el sustrato, además de buena capacidad de aireación y adecuada retención de humedad, que favorecieron en conjunto el metabolismo del vegetal y con ello un mayor crecimiento, lo que está en correspondencia con los criterios establecidos por Marinucci *et al.* (2002), Bortolotti *et al.* (2003) y Rodríguez *et al.* (2007) en cuanto a indicadores de calidad para establecer sustratos que ofrezcan buenos beneficios a los cultivos.

Los resultados demuestran que un aspecto importante para establecer un sustrato de reconocida calidad y que pueda ser reproducible, es definir su contenido de materia orgánica entre otros aspectos, corroborando lo planteado por Paneque (1998), en cuanto a que el efecto beneficioso de los abonos orgánicos sobre el suelo y los cultivos, está determinado por la cantidad de materia orgánica que se aplica y no por la cantidad de abono orgánico en sí y por Julca-Otiniano *et al.* (2002), en cuanto a la importancia de establecer las proporciones del material orgánico en las mezclas, aún cuando se utilicen los mismos materiales. Además, en los criterios de selección debe tenerse en cuenta, su abundancia y cercanía a las áreas de aclimatización, para que puedan contribuir al incremento de la eficiencia en los protocolos de micropropagación que se establezcan (Rodríguez, 2005 y Vilchez *et al.*, 2007).

Se concluye que la mezcla de la pulpa de henequén descompuesta con zeolita, favorece la aclimatización de las plántulas de henequén, lo que supera los resultados de supervivencia que se habían alcanzado con el sólo uso del material orgánico individual como sustrato. En presencia del 10 % de MO se produjeron los mejores resultados en supervivencia y área foliar y masa seca, pues en esta mezcla se logró una proporción equilibrada entre la capacidad de retención de

humedad y el intercambio gaseoso del sistema radical, lo cual favorece los procesos biosintéticos, que juegan un papel importante en el proceso de crecimiento.

4.3. Estudio del comportamiento de plántulas de henequén bajo diferentes condiciones de sustrato y marco de plantación en la fase de previvero

El análisis del desarrollo de las plántulas durante la etapa de previvero, teniendo en cuenta el comportamiento de los indicadores evaluados, se presenta en la tabla 9.

Tabla 9. Efecto del sustrato y el marco de plantación sobre el desarrollo de las plántulas.

Sustrato	Factores		Talla (cm)	Grosor (cm)	No. hojas
	Marco de Plantación	Tratamientos			
P. henequén descompuesta	10 x 10	1	19,4 ^a	1,90 ^a	7,5 ^a
	15 x 15	2	20,2 ^a	1,68 ^{ab}	7,1 ^a
P. henequén descompuesta más suelo (10 % MO)	10 x 10	3	19,7 ^a	1,80 ^a	7,2 ^a
	15 x 15	4	20,8 ^a	1,81 ^a	7,2 ^a
Suelo sólo	10 x 10	5	17,0 ^b	1,42 ^{bc}	5,4 ^b
	15 x 15	6	15,3 ^b	1,30 ^c	4,5 ^c
ESx			0,70**	0,11**	0,21**

Tratamientos con letras diferentes difieren significativamente para $p < 0.05$ ($n = 30$).

Para los tres indicadores evaluados, los mejores comportamientos se ubican en los tratamientos donde se utiliza la pulpa de henequén o la mezcla de ésta con

suelo (tratamientos 1, 2, 3 y 4), los cuales mostraron diferencia significativa con los tratamientos en que se utiliza el suelo solo (tratamientos 5 y 6).

Estos resultados coinciden con lo informado por Otero (1999), en una amplia recopilación de aspectos relacionados con la ecología, botánica y fitotecnia de este cultivo hasta el año 1999. Este autor refiere óptimos marcos de plantación de 10 x 10 y 15 x 10 cm para establecer semilleros o pre viveros para el cultivo del henequén dentro de la vía tradicional de propagación. Y con la aplicación de residuos de henequén bien descompuestos mejoran las condiciones del área (suelo). También los resultados se corresponden con lo encontrado por Eastmond *et al.* (2000), los cuales indicaron que plantas de henequén micropropagadas, sembradas en bagazo (pulpa de henequén descompuesta) en condiciones de vivero, se desarrollan más rápidamente que las plantas de campo, producen un mayor número de hojas y alcanzan una mayor talla.

Los beneficios del uso de la pulpa de henequén descompuesta como sustrato para establecer las plántulas o posturas de henequén, de acuerdo con los diferentes métodos de propagación, pueden estar asociado con la riqueza mineral de este material, en el que está presente el calcio entre otros macroelementos, como nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio (Tabla I, Anexo 2). Los terrenos para establecer los semilleros o previveros deben ser ricos en cal y de pH neutro o alcalino de acuerdo con los instructivos técnicos de este cultivo. Además, esta necesidad de calcio puede estar asociada a que este elemento es de vital importancia para los agaves. El consumo del calcio que hacen los agaves no es un consumo de lujo, en ausencia del mismo al momento del trasplante, las plantas son incapaces de emitir raíces y mueren cuando se les acaban sus reservas nutritivas (Otero, 1999).

En el henequén según plantea Otero (1999), el calcio tiene un papel importante en los puntos de actividad meristemática. Especialmente en la raíz el calcio es componente de la lámina de las células en forma de pectatos de calcio y no es fácilmente traslocable en la planta. Se ha podido determinar en este cultivo, que el calcio ejerce cierta influencia en la capacidad de intercambio catiónico en la raíz y

presenta una correlación positiva con el contenido de este elemento. Cuando el mismo está deficiente, se altera el crecimiento radical, mientras que en cantidad suficiente causa efectos favorables en el equilibrio hídrico, además, actúa en la penetración de las raíces en las profundidades del perfil del suelo.

En correspondencia con todo el análisis hecho respecto a los beneficios de la pulpa de henequén, es importante señalar, que el cultivo de henequén a pesar de su rusticidad, y de ser una especie que ha sido marginada a áreas semiáridas y terrenos rocosos con escasa capa arable, responde con incrementos significativos de su rendimiento cuando es tratado con abonos minerales (Vincent *et al.*, 1998) Cada elemento nutritivo juega su papel en esta especie y su utilización como abono puede incrementar los rendimientos.

Las características de la pulpa de henequén descompuesta en cuanto a su riqueza nutritiva, en la que están presente altos contenidos en calcio, como se destacó anteriormente y la peculiaridad de su fácil obtención la han hecho favorita para ser empleada como sustrato en condiciones de vivero para el cultivo del henequén en los métodos de propagación tradicional.

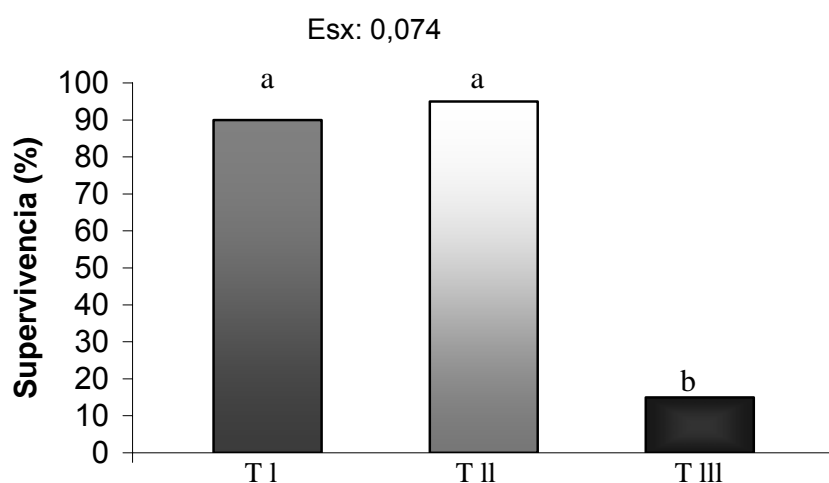
El marco de plantación está más relacionado con la calidad de las plántulas y la fitotecnia del cultivo desde el punto de vista de la densidad de población de acuerdo con las características morfológicas del cultivo y el aprovechamiento del área. Al respecto, la distancia entre las plantas debe permitir el manejo de las atenciones culturales como las limpiezas manuales y evitar que las espinas marginales y apicales ocasionen lesiones entre sí o incluso a los propios productores. Es por esto que en condiciones de previvero o vivero, puede moverse en pequeños rangos de marcos de plantación, según establece el instructivo técnico citado por Otero (1999), en dependencia del tamaño de la postura dentro de los parámetros de calidad establecidos para las mismas. Sin embargo en los resultados mostrados en la tabla 9, la combinación de los marcos de plantación con la condición de suelo sólo (tratamientos 5 y 6), reflejaron los valores más bajo en los indicadores evaluados, como ya se destacó anteriormente.

En este ensayo el empleo de sólo pulpa de henequén descompuesta como sustrato para las plantas aclimatadas no afectó los indicadores del crecimiento, pues estos presentan un comportamiento similar en la mezcla de suelo pulpa de henequén fermentada (10 % MO). Ello sugiere que las plantas en la fase de aclimatización, a diferencia de las aclimatadas son muy sensibles cuando no se logra la proporción entre la capacidad de aireación y retención de agua por el sustrato solamente orgánico o con un porcentaje de materia orgánica superior al 10%.

Se concluye que las plantas de henequén micropropagadas se favorecen en condiciones de previvero con el empleo de la pulpa de henequén descompuesta como sustrato orgánico individual o mezclado. Al no presentar diferencias entre los marcos de plantación, 10 x 10 cm es mejor porque se logran más plantas por superficie del suelo y se logra aprovechar más éste, además de ser suficiente como área vital para el crecimiento y desarrollo de las plántulas en estas condiciones, hasta que alcancen los indicadores de calidad establecidos, que les permita su trasplante a la fase de vivero tradicional.

4.4. Efecto del incremento del flujo de fotones fotosintéticos (FFF) y la reducción de la humedad relativa (HR) en la supervivencia de las plántulas durante la aclimatización

La figura 6 muestra los efectos que ejerce el manejo de las condiciones ambientales en las casas de cultivo sobre la supervivencia de las plántulas de henequén durante la aclimatización.



Tratamientos	De 0 a 15 días	De 15 a 60 días
	(HR %; FFF $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	(HR %; FFF $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
T I	$\geq 90 \%$; $558,74 \leq \text{FFF} \leq 686,55$	$\geq 90 \%$; $558,74 \leq \text{FFF} \leq 686,55$
T II	$\geq 90 \%$; $558,74 \leq \text{FFF} \leq 686,55$	80 %; $1\ 303,37 \leq \text{FFF} \leq 1\ 602,04$
T III	$\geq 90 \%$; $558,74 \leq \text{FFF} \leq 686,55$	(75 – 79 %); $1\ 941,42 \leq \text{FFF} \leq 2\ 288,57$

Figura 6. Comportamiento de la supervivencia de las plántulas de henequén, de acuerdo con las variaciones de las condiciones ambientales durante la aclimatización.

En la figura 6 se observa que el cambio de las plántulas a condiciones de ambiente natural (T III), después de un período de 15 días en condiciones similares a las que estuvieron durante el cultivo *in vitro* (alta humedad relativa y baja intensidad luminosa), provocó una disminución significativa en la supervivencias de las mismas (mortalidad superior al 80 %). Sin embargo cuando la transferencia se hizo a un ambiente donde la disminución de la humedad relativa fue menos drástica (80 % HR) y el nivel de la intensidad luminosa fue solamente del 70 % de las condiciones naturales presentes ($1\ 303,37 \leq \text{FFF} \leq 1\ 602,04 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), (T II), la supervivencia de las plántulas mantuvo un comportamiento favorable.

La baja supervivencia alcanzada en las condiciones del tratamiento III, estuvo caracterizada fundamentalmente por desecación y marchitez de las plántulas cuando se hizo el cambio a las condiciones de ambiente natural, lo que puede estar muy relacionado con el hecho de que en las plántulas de henequén, a los 15 días del proceso de aclimatización puedan estar presente deficiencias en la

funcionalidad de los estomas y en las estructuras de las hojas, que les impide realizar un control eficiente de las pérdidas de agua y realizar procesos fotosintéticos eficientes, además bajo estas condiciones que no son controladas el viento moderado puede incidir en estimular una mayor desecación de este tipo de material, lo que evidencia la alta diferencia en la supervivencia de las plántulas de este tratamiento (T III), con relación a los tratamientos I y II.

Por otro lado, este comportamiento puede estar vinculado también a un efecto de fotoinhibición del aparato fotosintético, hecho que usualmente puede presentarse cuando las plántulas micropropagadas son expuestas a las condiciones de mayor intensidad luminosa presente en el ambiente natural, lo que ha sido confirmado por diferentes autores (Pospisilova *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2005). Se asocia además el pobre o nulo desarrollo del sistema radical alcanzado por las plántulas a los 15 días de transcurrido el proceso de aclimatización, a lo que ya se hizo mención en el experimento 4.1, y que es otra limitación, quizás la principal, que les impide adaptarse eficientemente a las nuevas condiciones de los exteriores (Izquierdo *et al.*, 2002; Aragón *et al.*, 2006).

El comportamiento favorable en la supervivencia de las plántulas como se muestra en los resultados que se alcanzaron con el tratamiento II, corrobora el análisis hecho en el párrafo anterior. Se evidencia que un manejo cuidadoso de la humedad relativa y de la intensidad luminosa (disminución gradual de humedad relativa e incremento gradual de la intensidad luminosa) durante el período de aclimatización, permite que las plantas provenientes de la micropropagación por cultivo de tejido puedan corregir durante esta etapa las anomalías presente en su anatomía y procesos fisiológicos, consecuencia del cultivo *in vitro* y que les permite una mejor adaptación al medio natural cuando son transferidas a los ambientes exteriores.

En esta etapa en la medida que las plántulas puedan estar expuestas a condiciones de mayor intensidad luminosa y menor humedad relativa sin comprometer su supervivencia, se favorece el proceso de trasplante a los ambientes naturales de los exteriores.

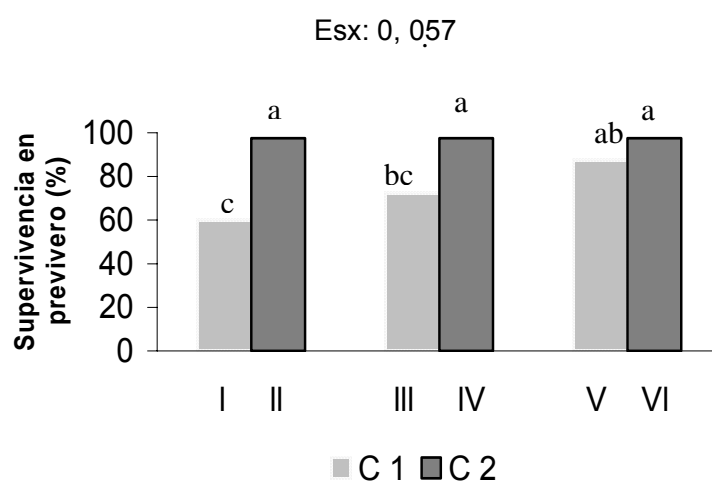
Diferentes autores coinciden en destacar que las alteraciones en la morfología y fisiología de las plántulas obtenidas por cultivo *in vitro*, las hacen muy susceptible a la desecación y fotoinhibición cuando son transferidas del ambiente *in vitro* a los exteriores (Preece y Sutter, 1991; Pospisilova *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2005). Este hecho se considera la causa fundamental de las altas tasas de mortalidad durante las primeras semanas de aclimatización, si no se controlan los factores ambientales, para evitar el exceso de transpiración de las plántulas. En tal sentido se ha informado la importancia de un cuidadoso tratamiento en cuanto al manejo de la intensidad luminosa y de la humedad relativa en las casas de cultivo para favorecer el proceso de adaptación de las plántulas a las nuevas condiciones ambientales y acelerar el tránsito de las mismas por esta fase (Agramonte *et al.*, 1998; Yanes *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2005; Viegas *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2005; Barra y Mogollón, 2007).

En *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) Viegas *et al.* (2005), encontraron que la supervivencia de las plántulas fue 0 % cuando fueron transferidas de las condiciones *in vitro* a condiciones de mayores intensidad de luz (pleno sol), sin embargo en condiciones de manejo de este factor (70 y 80 % de sombra) durante las cuatro primeras semanas, la supervivencia de las plántulas se incrementó por encima del 90 %.

En este ensayo se concluye que en las plántulas de henequén, las primeras dos semanas en las casas de cultivo, y cambios graduales a otras condiciones diferentes del ambiente, son decisivas para obtener altos porcentajes de supervivencia en la etapa de aclimatización. Durante este período además de la calidad de las plántulas y la selección del sustrato que favorezca su crecimiento, el control de la humedad relativa (≥ 90 %) y de la intensidad luminosa ($558,74 \leq \text{FFF} \leq 686,55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) son aspectos fundamentales a tener en cuenta.

4.5. Efecto del momento de traslado de las plántulas desde las condiciones de ambiente controlado (aclimatización) a ambiente natural (previvero)

La figura 7 muestra los efectos del momento de traslado de las condiciones de ambiente controlado (aclimatización) a ambiente natural (previvero), sobre los porcentajes de supervivencia de las plántulas de henequén, teniendo en cuenta dos condiciones de manejo del ambiente en las casas de cultivo, según los resultados obtenidos en el experimento anterior (experimento 4.4).



Manejo de las condiciones ambientales en la casa de cultivo		Momento de Traslado (días)		
Condiciones	Desde 15 a 60 días	30	45	60
C1	HR \geq 90 % y ($558,74 \leq \text{FFF} \leq 686,55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.)	I	III	V
C2	80 % HR y ($1\,303,37 \leq \text{FFF} \leq 1\,602,04 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	II	IV	VI

Figura 7. Efecto del momento de traslado a condiciones de previvero en la supervivencia de plántulas de henequén.

En la figura 7 se observa que las plántulas provenientes de la condición 2 (Tratamientos II, IV y VI) alcanzaron niveles de supervivencia superiores y similares en todos los momentos de traslado para el previvero, los cuales se diferenciaron significativamente de los casos de la condición 1 a los 30 y 45 días (tratamientos I y III). Sin embargo, las plantas que se trasladaron a los 60 días

provenientes de la condición antes mencionada (tratamiento V), también presentaron niveles de supervivencia significativamente similares a los alcanzados en todos los momentos de traslado por las plantas de la condición 2.

En este resultado se demuestra que con solo 30 días (no 60) de endurecimiento son suficientes para lograr una alta supervivencia en la fase de previvero ya que permiten un más rápido acercamiento al patrón de desarrollo autotrófico que condiciona a las plántulas para enfrentar los rigores de los ambientes naturales y lograr su adaptación. Cuando el cambio se hace de manera gradual, definiendo además el período crítico del proceso, permite establecer condiciones óptimas para el manejo del ambiente en las casas de aclimatización y acelerar el tránsito de las plántulas por esta etapa, lo que beneficia económicamente la tecnología que se establece.

Por lo antes expuesto, una vez que las plántulas se adaptan y logran la capacidad para realizar procesos fotosintéticos, mantenerlas en estas condiciones (alta humedad relativa y baja intensidad luminosa), retarda el total restablecimiento de sus estructuras y de sus procesos fisiológicos, lo que conlleva a un retraso de su traslado a los exteriores (previvero). Ello compromete la eficiencia del protocolo.

Se concluye que las plántulas de henequén durante el proceso de aclimatización, que reciben el manejo de la condición 2 durante 30 días, logran un patrón de crecimiento y desarrollo que permite su traslado a previvero, lo que reporta beneficio económico al proceso de aclimatización. Con los resultados alcanzados se sugiere profundizar en el conocimiento y evaluación del comportamiento anatomorfológico y fisiológico de las plántulas durante el período de aclimatización, para tomar decisiones que realmente conlleven a lograr mayor calidad de todo el proceso, además del mejoramiento del aspecto económico.

4.6. Estudio de algunos cambios anatomorfológicos y fisiológicos producidos en las plántulas durante la aclimatización

Con relación a los resultados de la prueba de análisis discriminante (Tabla 10), se puede observar que las tres primeras funciones o ejes discriminantes son

significativos para diferenciar los grupos. Sin embargo el aporte de las funciones 1 y 2 a la diferenciación entre los grupos es del 85,52 %, lo cual indica que con estos dos ejes se puede explicar el comportamiento de las poblaciones estudiadas. La más importante o de mayor contribución es la función 1, que extrae el 60,66% de la diferencia entre los grupos.

Tabla 10. Variabilidad explicada y significación de las funciones discriminantes

Números de casos completos: 50				
Número de grupos: 5				
Función Discriminante	Autovalor	Porcentaje Relativo	Porcentaje acumulado	Correlación Canónica
1	5,84	60,66	60,66	0,924
2	2,39	24,86	85,52	0,840
3	0,97	10,12	95,64	0,702
4	0,41	4,36	100	0,543
Funciones Derivadas	Wilks Lambda	Chi-Cuadrado	GL	P- Valor
1	0,015	171,30	44	0,0000
2	0,104	92,42	30	0,0000
3	0,356	28,42	18	0,0010
4	0,704	14,37	8	0,0725

El resultado mostrado en la tabla 11, refleja un bajo porcentaje de individuos mal clasificados, lo que sugiere que las variables analizadas discriminan de forma eficiente los grupos, por ello se indica que existe diferencia entre las plantas durante el proceso de aclimatización. En tal sentido, el tratamiento que se corresponde con el momento de la salida *in vitro* (Grupo I), tiene características específicas muy diferentes al resto de los grupos, que responden a los diferentes momentos del proceso de aclimatización (Grupos II, III, IV y V), por lo que éstos se separan en su totalidad del grupo I. Este hecho evidencia comportamientos diferentes de las variables medidas con relación a los tratamientos en estudio, lo que presupone estados morfo-fisiológicos diferentes de las plántulas en las

condiciones *ex vitro* con relación a las *in vitro*. No obstante en el tratamiento de 30 días se observan individuos con comportamientos similares a los del grupo IV (45 días) y en el de éste con características similares a los del grupo V (60 días).

Tabla 11. Clasificación de los individuos según funciones de análisis discriminante. (% de buena clasificación)

Grupos de plántulas	I	II	III	IV	V
I	100 %	0	0	0	0
II	0	100 %	0	0	0
III	0	0	90 %	10 %	0
IV	0	0	0	80 %	20 %
V	0	0	0	0	100 %

Los grupos de plantas señalados, se corresponden con los tratamientos evaluados de la siguiente forma: grupo I (salida *in vitro*); grupo II (15 días); grupo III (30 días); grupo IV (45 días) y grupo V (60 días). Los días se refieren a días en el proceso de aclimatación.

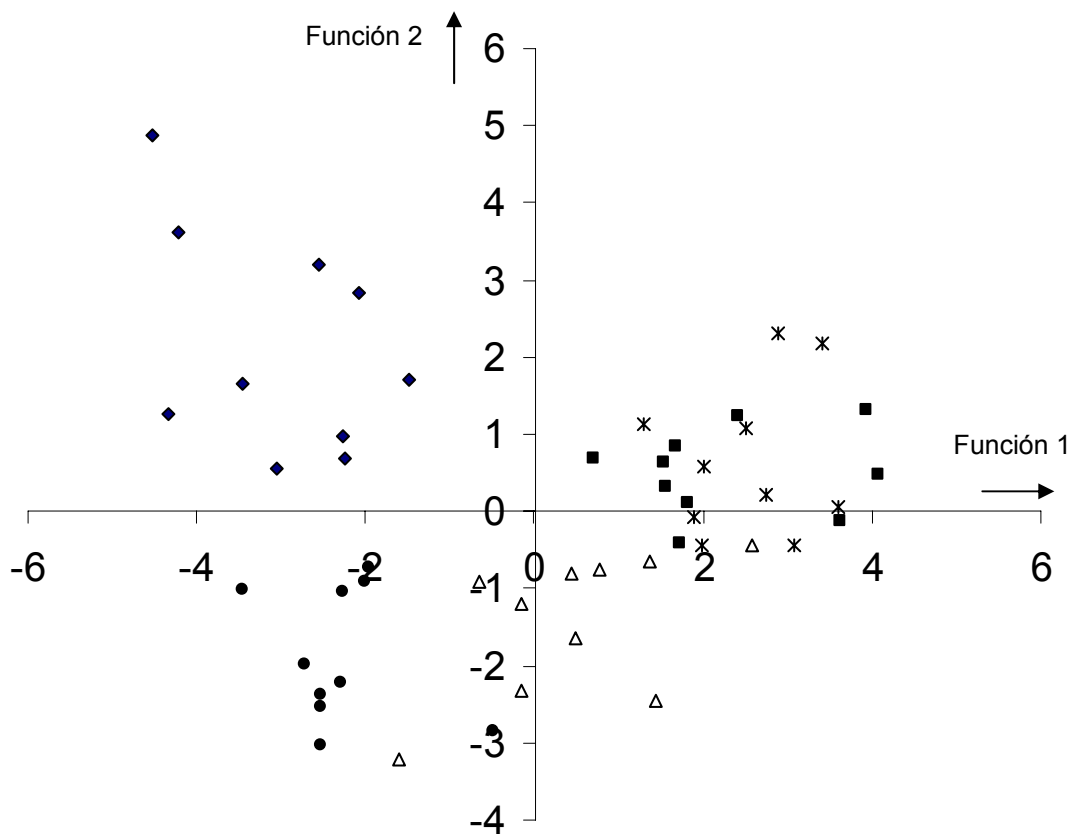
La distribución espacial de los grupos de individuos en el gráfico de funciones discriminantes (Figura 8), arroja que para el eje discriminante 1 los individuos ubicados en los cuadrantes de la izquierda (grupo I) se corresponden fundamentalmente con la totalidad de los individuos del tratamiento de salida *in vitro*, y con la totalidad de los individuos del grupo II o 15 días de aclimatación, y con un menor número de individuos del grupo III o 30 días de aclimatación, el resto de los individuos del grupo III, con la totalidad de los individuos de los grupos IV y V (45 y 60 días de aclimatación respectivamente), se ubican en los cuadrantes de la derecha.

A partir del análisis de la tabla de correlaciones en la propia figura 8, se puede decir, que el eje 1 diferencia a los grupos en mayor medida, atendiendo a su comportamiento en las variables ancho de las hojas (ancho hojas) y el número de hojas (No hojas), siendo esta la diferencia más marcada que se establece entre los grupos.

Tabla de Correlaciones		
VARIABLES	Función 1	Función 2
ancho hojas	0,84	-0,18
Á.f	0,44	-0,30
CRA	0,21	-0,16
Mf.R	-0,38	0,80
Mf.R/Mf.P	-0,33	0,73
Mf.P	-0,25	-0,13
Ms.T	0,44	-0,15
No hojas	-0,70	-0,13
No Raíces	-0,20	0,84
Talla	-0,28	-0,01
Ψ_h	0,43	0,51

Lo que se expresa es la contribución de la variable

Gráfico de Funciones Discriminantes



◆ *Salida in vitro* • 15 días △ 30 días ■ 45 días * 60 días

Figura 8. Distribución de los 10 individuos en estudio por cada grupo, de acuerdo con las funciones Discriminantes 1 y 2.

Por otra parte el eje 2 discrimina a los grupos atendiendo a su comportamiento en las variables número de raíces (No Raíces), masa fresca de la raíz (Mf.R), relación

masa fresca de la raíz-masa fresca de la planta (Mf.R/Mf.P) y potencial hídrico foliar (ψ_h).

De acuerdo con la contribución de las variables en el eje 1, las plántulas en el momento de su salida *in vitro* y hasta los 15 días de aclimatización presentaron mayor número de hojas, pero fueron más finas, por el contrario, en las de 45 y 60 días de la aclimatización las hojas fueron más anchas, pero se presentaron en menor número, ello sugiere que las hojas de las plántulas por el efecto de un mayor tiempo de aclimatización se engrosan más que las de la salida *in vitro* o 15 días, dado que alcanzan un metabolismo más eficiente por presentar un desarrollo morfológico superior, sin embargo estos se caracterizan por tener menor número de hojas, pues al parecer en el proceso de aclimatización de henequén, en las condiciones de estudio creadas, se favorece el proceso de senescencia, con relación a la emisión de hojas.

Del tratamiento de 30 días de aclimatización se puede decir que sus individuos tienen un comportamiento más cercano a los tratamientos de 45 y 60 días, ya que en un mayor número de ellos, tiene mayor contribución el ancho de las hojas que el número de éstas, lo que indica una separación de los tratamientos de la salida *in vitro* y de 15 días, posiblemente por la adquisición del patrón de desarrollo autotrófico.

En relación con la segunda función discriminante, se puede destacar que los grupos I, IV y V presentan los mayores valores de las variables número de raíces (No Raíces), masa fresca de la raíz (Mf.R), relación masa fresca de la raíz-masa fresca de la planta (Mf.R/Mf.P) y potencial hídrico foliar (ψ_h), y por el contrario en los grupo II y III, se presentaron los menores valores de estas variables.

También de este análisis se puede afirmar que las plántulas en el momento de la salida *in vitro* y hasta los 15 días de la aclimatización se caracterizan por presentar mayor número de hojas (las procedentes del cultivo *in vitro*), pero éstas son más finas, sin embargo a los 30, 45 y 60 días del proceso de aclimatización el aumento en el ancho de las hojas tiene mayor contribución para expresar la diferencia entre estos grupos y el de la salida *in vitro* y 15 días, debido a que el número de hojas tiende a disminuir durante este período, como consecuencia del proceso de

senescencia de la hoja más vieja de la fase *in vitro*, lo cual es estimulado por las condiciones desfavorables a que se someten las plántulas cuando son transferidas a condiciones *ex vitro*.

Finalmente los resultados que se muestran en la tabla 11 y la figura 8 sugieren que las plántulas van adquiriendo un carácter autotrófico (no comprobado), pues las plántulas en el momento de la salida *in vitro* (grupo I) presentan un número de raíces elevado, comparable a las de 45 y 60 días, pero no funcionales. A los 15 y 30 días se presenta un menor número de raíces, pero estas son funcionales, alcanzándose un mayor número de ellas a los 45 y 60 días. Esto de conjunto con las modificaciones en las hojas sustenta la sugerencia de la adquisición de la autotrofia en el proceso de aclimatización, ello además se corresponde con que la mortalidad ocurre de 0 a 15 días y no posterior a este período. En cuanto al potencial hídrico se puede observar que los grupos I (salida *in vitro*) y IV y V (45 y 60 días respectivamente), presentaron valores similares, pero las causas del mismo son diferentes: en el primero, dadas las condiciones *in vitro* y en el segundo, por una adquisición de funcionalidad de la plántula.

Por último se puede sugerir que las variables medidas permiten diferenciar los tratamientos de salida *in vitro* y de 15 días entre sí y de los restantes. Sin embargo, en los grupos III, IV y V aparecen mezclados individuos de los tratamientos 30, 45 y 60 días de aclimatización, lo que evidencia que las variables de mayor contribución en las funciones discriminantes no permiten definir la ubicación diferenciada entre sí de ninguno de estos tratamientos. Este resultado sugiere, que las plántulas de henequén con 45 o 60 días en las casas de aclimatización, no adquieren cambios significativos en las variables del desarrollo evaluadas que las diferencien del estado de desarrollo alcanzado por las plantas a los 30 días, de acuerdo con las condiciones de estudio creadas.

Referente a los estudios anatómicos realizados, en las figuras 9, 10, 11, 12, 13 y 14 se muestran las características del tejido epidérmico y de las células del mesófilo de las hojas de las plántulas en los distintos momentos establecidos para evaluar el proceso de aclimatización, así como características de su estructura en condiciones naturales.

En la figura 9 (A) como consecuencia del ambiente *in vitro*, el tejido epidérmico se presenta en el momento de su salida a las condiciones *ex vitro*, con células rectangulares de extremos aguzados, con estomas que no han completado su desarrollo y delgadas paredes celulares, observándose características similares durante los primeros 15 días, pero las células típicas pierden los extremos aguzados y se observan las cuatro células acompañantes de estoma bien definidas (Figura 9 B). Estas características evidencian el poco desarrollo de la estructura del tejido epidérmico bajo estas condiciones, lo que no favorece el normal funcionamiento de los estomas y es por ello que se produce una mayor pérdida de agua durante los primeros 15 días de la aclimatización lo que puede ser la consecuencia de la pérdida de plántulas en esta etapa entre otros factores. A los 30 días (Figura 9 C) se observan cambios en la morfología, donde las células epidérmicas son de mayor tamaño, con paredes todavía delgadas, siendo estos cambios más visibles, con paredes celulares engrosadas a los 45 y 60 días respectivamente (Figura 9 D y 9 E). Lo que evidencia que después de los 15 días de estancia de las plántulas en las condiciones *ex vitro* (casa de cultivo), comienzan a verse transformaciones celulares en el tejido epidérmico de las hojas, hacia las características estructurales similares a las obtenidas en condiciones naturales para esta especie como se muestra en la figura 9 (F), donde aparece una sección del tejido epidérmico de la cara adaxial con células tabulares, aparato estomático bien desarrollado, con cuatro células acompañantes, estoma tetracítico según clasificación de González (2006), paredes celulares engrosadas, y cutícula gruesa como se describe para esta especie de monocotiledónea (Esau, 1985).

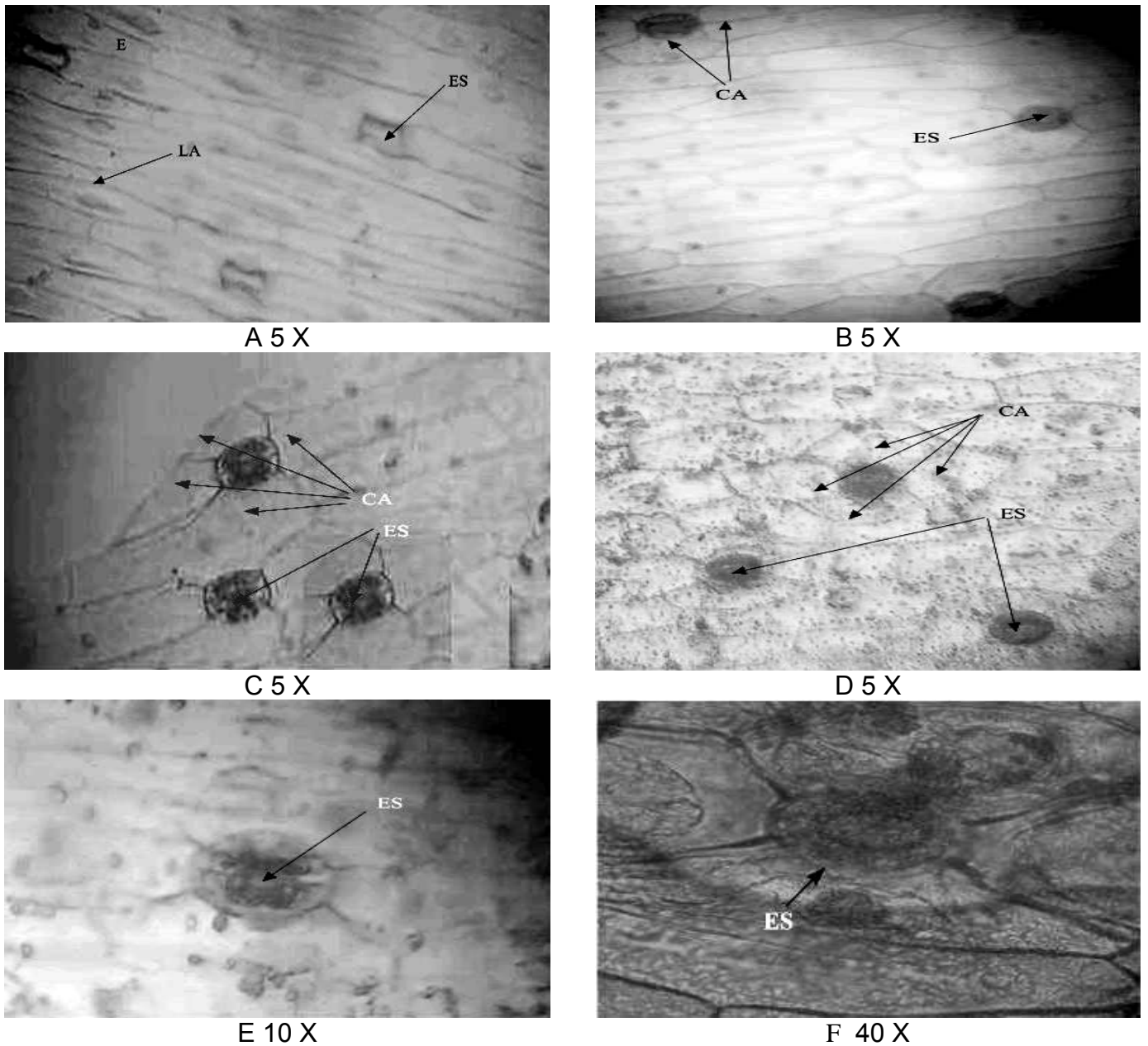


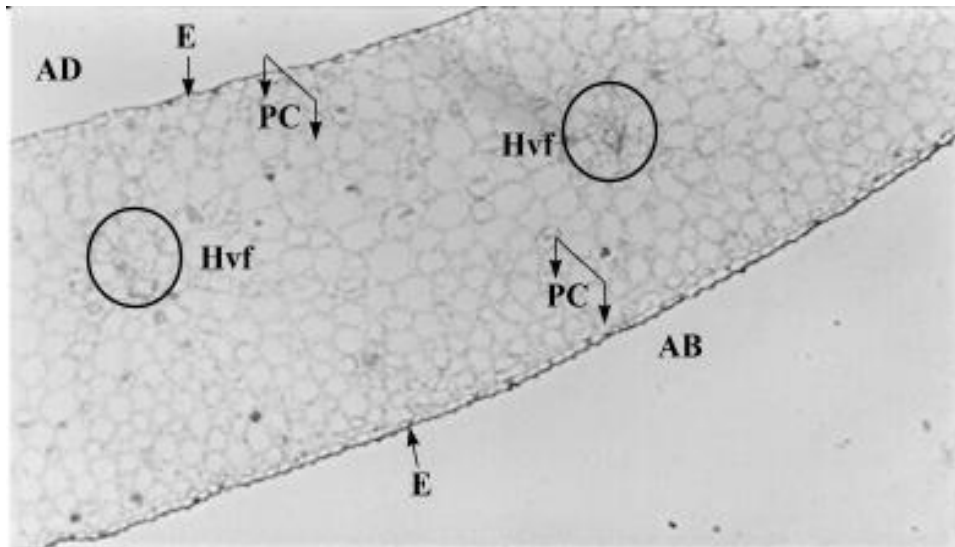
Figura 9: Superficie adaxial foliar de las plántulas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem) en el momento de su salida de la fase *in vitro* y durante el proceso de la fase de aclimatización. A- Plántula al momento de su salida de *in vitro*. B, C, D y E, plántulas con 15, 30, 45 y 60 días de transcurrido el proceso de aclimatización. F- planta control (planta en condiciones naturales).

ES – estoma, CA – células acompañantes, E – epidermis, LA – lado aguzado, CO- células oclusivas.

En la condición del ambiente *in vitro*, la magnitud de la transpiración es pequeña debido a la restricción de flujo gaseoso en los recipientes de cultivo y la condición semiheterótrofa de los cultivos, mientras que bajo condiciones de aclimatización la planta requiere de una mayor tasa de intercambio gaseoso con el ambiente, lo que podría resultar en una transformación gradual de los caracteres citológicos del tejido epidérmico, La variación de las células típicas epidérmicas y los estomas desarrollados durante la aclimatización podría ser interpretada como señal de un mayor control del balance hídrico, lo que explica que el restablecimiento de la estructura de la epidermis influye en que a partir de los 30 días de aclimatización se eleva el porcentaje de supervivencia.

Estos cambios fueron informados de igual manera para la especie *Cattleya jenmanii* Rolfe por Torres *et al.* (2006). Este comportamiento indica además una respuesta al endurecimiento de las plántulas de henequén a partir de los 15 días, con la aparición de cambios en la anatomía de la epidermis. Resultados similares han sido informados para diferentes especies por varios autores (Pospisilova *et al.*, 1999; Malda *et al.*, 1999 y 2000; De Fréitez y Páez, 2004).

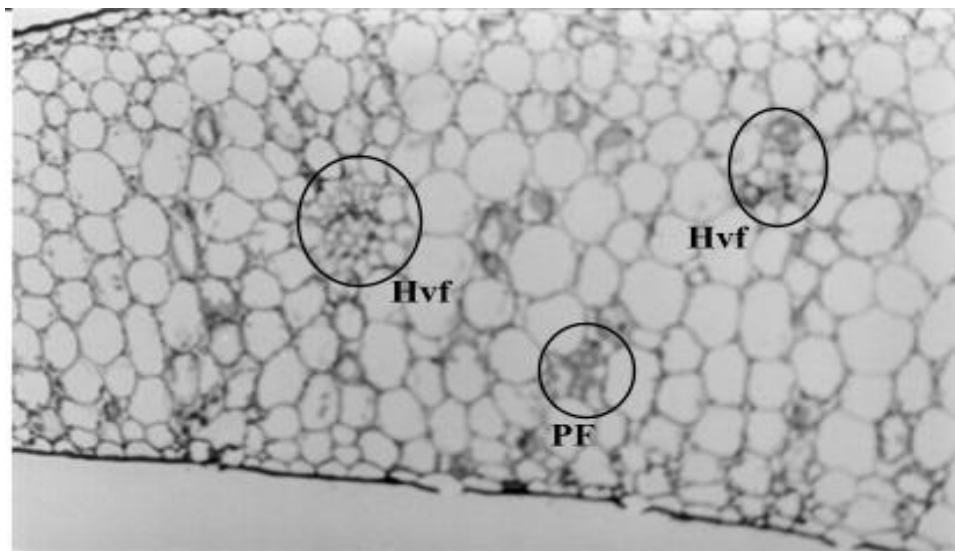
En relación con las células del mesófilo, en los cortes transversales se aprecia un parénquima clorofílico con espacios intercelulares relativamente pequeños. Los haces vasculares se encuentran en formación, dispersos en el mesófilo (Figura 10). Las fibras están asociadas con los haces vasculares o aparecen como cordones independientes en el mesófilo formando paquetes de fibras (Figura 11).



(3,2 x)

Figura 10. Cortes transversales de hojas de plántulas de *Agave fourcroydes* Lem a la salida *in vitro*. E – epidermis, Hvf – haz vascular en formación, AD – superficie adaxial, AB – superficie abaxial, PC – parénquima clorofílico.

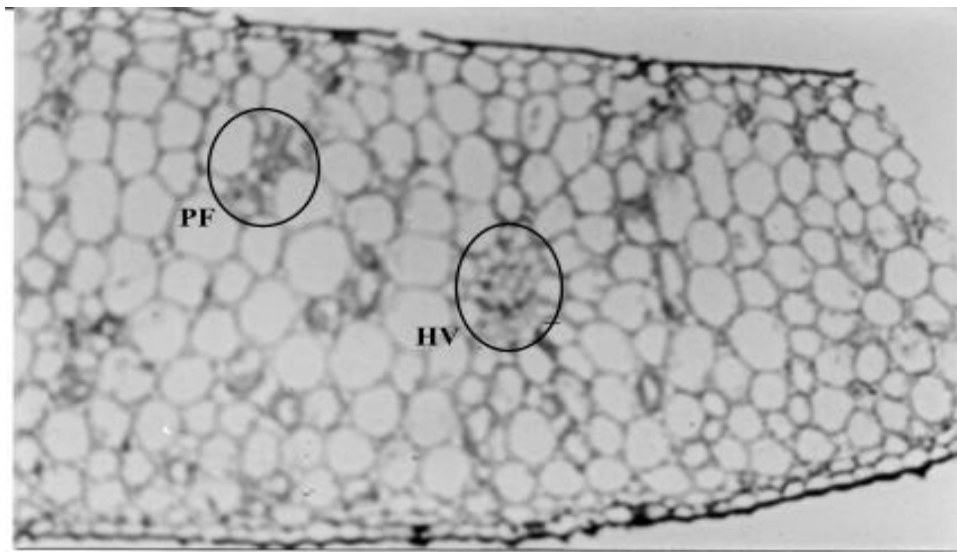
A los 15 días de comenzada la aclimatización de las plántulas (Figura 11), se apreciaron pocos cambios en el mesófilo de la hoja, donde se mantienen los haces vasculares en formación todavía sin la presencia de paquetes de fibras en el área floemática característica de esta especie según lo descrito por Macía (2006).



(10 x)

Figura 11. Cortes transversales de plántulas de *Agave fourcroydes* Lem con 15 días de aclimatización. Se observan células del mesófilo de aspecto redondeado, tanto en la parte más cercana a la epidermis como en la zona más interna del mesófilo. Hvf- haz vascular en formación, PF- paquete de fibras

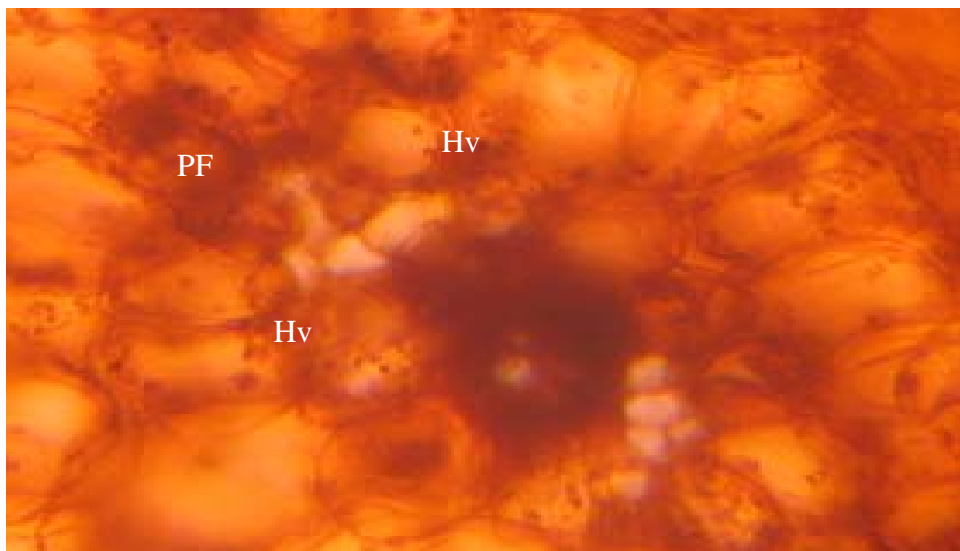
A partir de los 30 hasta los 60 días, se observó el desarrollo de las células de los haces vasculares dispersos en el mesófilo (Figura 12 y 13).



(10 x)

Figura 12. Corte transversal de plántulas de *Agave fourcroydes* Lem con 45 días de aclimatización.

Hv- haz vascular en formación, PF - paquete de fibras.



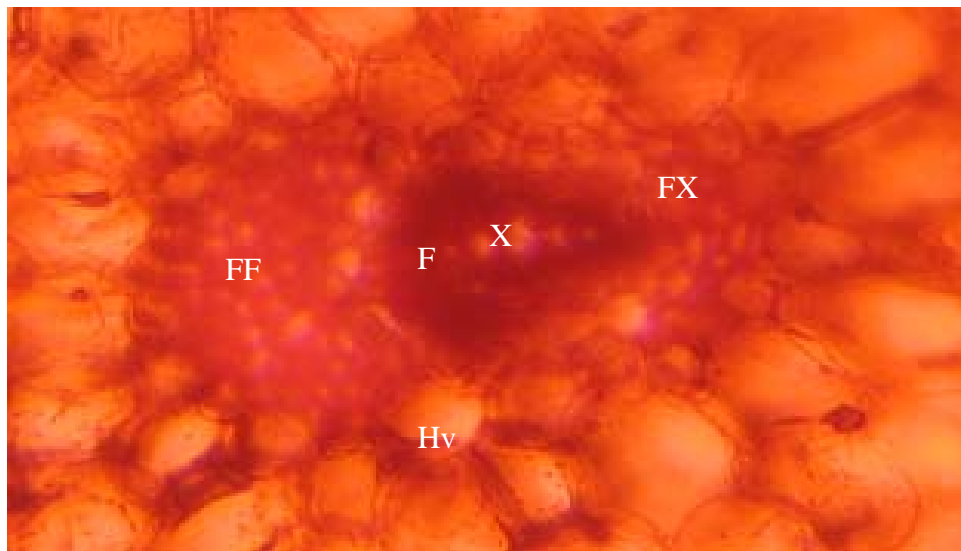
(40 x)

Figura 13. Corte transversal de plántulas de *Agave fourcroydes* Lem con 60 días de aclimatización.

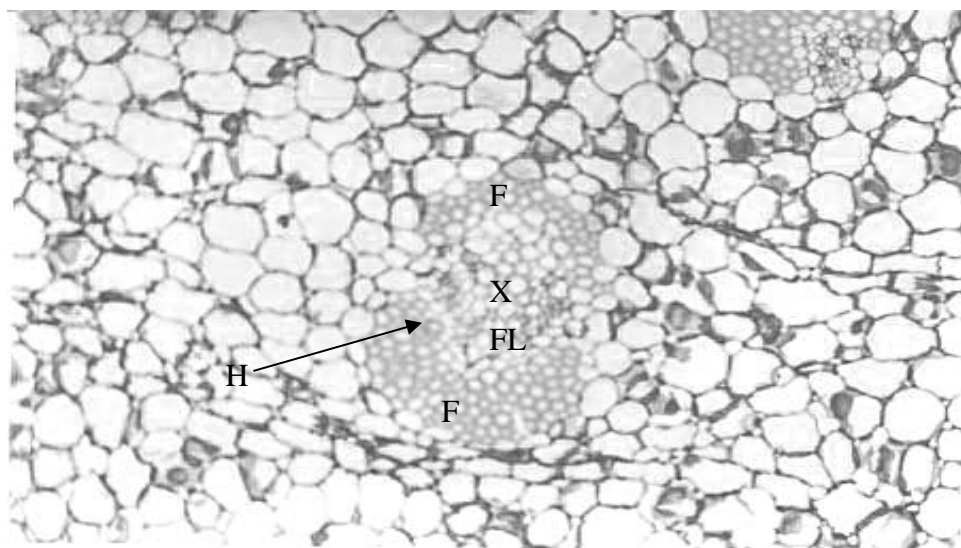
Hv- haz vascular.

Al comparar los resultados anteriores con las secciones transversales de hojas de plántulas obtenidas de las plantaciones de campo, se aprecia que a los 60 días, aunque ya están formados los haces conductores, todavía estos no tienen bien

diferenciado en abundancia los paquetes de fibras y las fibras del floema característicos de los haces de esta especie (Figura 14 A y B), por lo que se puede concluir que a los 60 días no se ha completado aún el desarrollo del mesófilo de la hoja de *A. fourcroydes*, sin embargo esto no parece tener influencia en la supervivencia de las plantas en el proceso de aclimatización.



A (40 x)



B (10 x)

Figura 14. Planta de campo (Bulbillo en condiciones naturales) La flecha indica:

H- haz colateral cerrado (bien definido), Hv- haz vascular, X- xilema, FX- fibras xilema, FL- floema, FF- fibras floema F- fibras.

El comportamiento de las variables del desarrollo e indicadores fisiológicos de las plántulas de henequén medidas al momento de su salida *in vitro* y durante los

distintos momentos establecidos de la etapa de aclimatización se presenta en la tabla 12. Se observa que el número de hojas y el número de raíces muestran una tendencia estable durante todos los momentos evaluados, por lo tanto no se produjo diferencia estadística en ambas variables en ninguno de los tratamientos.

Tabla 12. Comportamiento de algunas variables del desarrollo e indicadores fisiológicos de plántulas de henequén durante la etapa de aclimatización.

	0	30 % de luz ($558,74 \leq \text{FFF} \leq 686,55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) HR ≥ 90 %	70 % de luz ($1\ 303,37 \leq \text{FFF} \leq 1\ 602,04 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) HR: 80 %			Esx
		15	30	45	60 días	
No hojas	6,2	5,6	5,8	5,6	5	0,19 ^{NS}
No raíces	6,4	4,4	4,8	5	4,6	0,42 ^{NS}
Masa seca raíz (g)	0,010 ^b	0,009 ^b	0,015 ^{ab}	0,021 ^a	0,016 ^{ab}	0,002 [*]
Área foliar (cm²)	12,2 ^b	10,5 ^b	18,5 ^a	17,5 ^a	12,4 ^b	0,75 ^{**}
Masa seca total (g)	0,069 ^c	0,067 ^c	0,103 ^{ab}	0,126 ^a	0,084 ^{bc}	0,006 ^{**}
Contenido relativo de agua (%)	92 ^{ab}	90,5 ^b	93,6 ^a	93,5 ^a	93,6 ^a	0,003 ^{**}
Potencial hídrico (MPa)	-0,32 ^a	-0,46 ^b	-0,32 ^a	-0,32 ^a	-0,30 ^a	0,017 ^{**}

Tratamientos con letras diferentes difieren significativamente para $p < 0,05$.

Como se aprecia en los resultados expuestos en la tabla 12 con relación al número de hojas y número de raíces, se produjo una respuesta similar en cada momento de la evaluación, lo que sugiere que ambos procesos morfogénicos se mantuvieron muy estables y que del desarrollo de uno depende el desarrollo del otro. No obstante en la variable número de hoja se apreció una tendencia a la senescencia de la hoja más vieja de las producidas *in vitro*. A pesar de no haber diferencias en estas variables durante todo el proceso de aclimatización, los resultados logrados, sugieren la posible diferencia en funcionalidad en estos órganos posterior a los 15 días, lo que se recomienda investigar en este aspecto.

La masa seca de la raíz no difirió estadísticamente a partir de los 30 días con relación a los tratamientos de 45 y 60 días, pero sí se diferenció significativamente de los tratamientos de 15 días y a la salida *in vitro*. Ello sugiere que una vez emitida las nuevas raíces a partir de los 15 días y el cambio de condición ambiental, se produjo un incremento de la masa seca de la raíz, lo que indica crecimiento en las plantas, sin embargo a los 60 días se produjo una disminución aunque no significativa en esta variable. Este comportamiento se atribuye a que se producen modificaciones en las plántulas que deben conllevar a un acomodo de las funciones biológicas.

El área foliar alcanzó el mayor valor a los 30 días aunque no se diferenció del tratamiento de 45 días, pero ambos se diferenciaron del resto de los tratamientos, sin embargo, entre estos últimos (salida *in vitro*; 15 días y 60 días) no se produjeron diferencias estadísticas. Este resultado sugiere que el progresivo crecimiento de las plantas se estimuló con el cambio de condición (incremento de la intensidad luminosa y disminución de la humedad relativa) y en consecuencia la evolución morfogénica de las plantas. Contrario a lo antes descrito fue el comportamiento a los 60 días, en el cual la senescencia de una hoja influyó más que la emisión de una nueva.

Los tratamientos de 30 y 45 días no se diferencian significativamente en la variable masa seca total, sin embargo 45 días se diferenció estadísticamente del resto. El tratamiento de 30 días no se diferenció significativamente del tratamiento de 60 días pero sí se diferenció del de 15 días y salida *in vitro*. El comportamiento de esta variable se atribuye a los mismos factores que influyeron en las variables anteriores.

La ocurrencia de la senescencia de hojas en las plántulas procedentes del cultivo *in vitro* durante el proceso de aclimatización, puede ser favorecida debido al estrés producido cuando las plántulas son transferidas de las condiciones *in vitro*, a las condiciones de invernadero o de campo, lo que además puede estar asociado a una respuesta específica de las plantas al deterioro del entorno (Tadeo, 2000).

Por otra parte está demostrado que en muchas especies de plantas las hojas formadas *in vitro* son incapaces de seguirse desarrollando bajo condiciones *ex*

vitro, al tiempo que ellas son reemplazadas por hojas recién formadas (Pospisilova *et al.*, 1999 y Rogalski *et al.*, 2003).

En relación con los efectos morfológicos y fisiológicos provocados por la aclimatización, Diettrich *et al.* (1992) citados por Malda *et al.* (1999), informaron que en *Digitales lanata*, las hojas formadas *in vitro* son incapaces de seguirse desarrollando completamente bajo condiciones *ex vitro* y después de pocas semanas ellas son reemplazadas por hojas nuevamente formadas, que contienen estomas funcionales y cantidades normales de ceras epicuticulares. Sin embargo estos autores (Malda *et al.*, 1999), se refieren también a que la aclimatización en cactus, depende de diferentes atributos que ellos poseen y que han sido observados en otras especies de plantas. Según estos autores los cactus tienen tallos fotosintéticos en lugar de hojas y destacan que los cactus derivados del cultivo *in vitro*, no desarrollan nuevos primordios foliares mientras se están adaptando al cambio de las condiciones *ex vitro*. Mas bien el cuerpo entero de los cactus debe adaptarse gradualmente hasta completar la aclimatización y el total restablecimiento.

La senescencia de hojas durante la aclimatización en las plántulas de henequén tiene un efecto muy marcado sobre las variables del crecimiento, debido a la característica de esta especie a mantener un crecimiento sumamente lento durante las primeras fases de su desarrollo (Robert *et al.*, 1999).

Según Rodríguez (2005), durante la fase de aclimatización en caña de azúcar, se pueden establecer dos etapas bien diferenciadas. En un primer momento se produce un lento crecimiento con baja formación de raíces y hojas, que caracteriza los primeros 21 días, en el cual las plántulas realizan sus funciones a expensas de las reservas adquiridas en la fase *in vitro* y luego de esta fecha se realizan cambios en las condiciones de aclimatización que provocan una disminución en la mayoría de las variables del crecimiento y desarrollo. Posteriormente se aprecia un marcado incremento fundamentalmente en las masas fresca y seca, como resultado de la adaptación de las plántulas a las nuevas condiciones ambientales.

El Contenido Relativo de Agua (CRA) se presentó entre valores muy cercanos a lo largo de la fase en estudio. No obstante el valor observado a los 15 días difiere

significativamente de los obtenidos a los 30, 45 y 60 días, apreciándose un incremento en estos períodos. El menor valor observado a los 15 días, podría deberse a los efectos de las condiciones desfavorables a que se someten las plántulas cuando son transferidas de las condiciones *in vitro* a las condiciones de invernadero o de campo, lo que ya se ha discutido con anterioridad. Desde los 30 hasta los 60 días no hay diferencias entre los tratamientos.

El comportamiento exhibido por las plántulas de henequén durante la fase de aclimatización, en cuanto al estado hídrico, no resulta una particularidad para esta especie. Se ha demostrado que el retardo en el desarrollo de la cutícula, ceras epicuticulares y funcionamiento del aparato estomatal, durante el cultivo *in vitro*, causan altas tasas de transpiración cuticular y estomatal de las hojas de las plántulas cuando son sacadas de los frascos de cultivos (Santamaría *et al.*, 1995; Pospisilova *et al.*, 1999 y De Fréitez y Páez, 2004). Sin embargo se ha observado que durante la aclimatización en las condiciones *ex vitro* las tasas de transpiración cuticular y estomatal, generalmente decrecen debido a que la regulación estomatal se va haciendo más efectiva y la cutícula y las ceras epicuticulares se desarrollan.

Resultados similares en el comportamiento del estado hídrico de las plántulas durante las primeras semanas de la aclimatización, en plantas con metabolismo CAM, han sido informado por Malda *et al.* (1999 y 2000), en dos especies de cactus (*Caryophanthe minima* Baird y *Obregonia denegrii* Fric). Estos autores encontraron que la tasa de pérdida de agua durante la aclimatización fue alta para los primeros cinco días, sin embargo hubo una tendencia a estabilizarse hacia los 15 días. Informan además que la cantidad total de agua perdida durante los primeros 20 días de la aclimatización, fue significativa, pero no afectó la supervivencia de las plántulas, con posterioridad a este período las plántulas comenzaron su recuperación. Hecho que se asoció en este caso a la estructura suculenta de los cactus, lo que les permitió sobrevivir y recuperarse después de cierto grado de desecación, fundamentación que también puede aplicarse al Agave, por cuanto también clasifica como una planta suculenta (Aguirreolea, 2000; Dodd *et al.*, 2002).

En el Potencial hídrico foliar (Ψ_h) se produjo una disminución significativa de su valor a los 15 días, con respecto a la salida *in vitro* y los restantes momentos del

proceso de aclimatización. Ello pudiera ser consecuencia de la insuficiente preparación de las plántulas para crecer y desarrollarse en las nuevas condiciones, relacionado fundamentalmente con una incompleta capacidad para controlar el mecanismo de cierre y apertura de los estomas, como es típico de esta fase (Pospisilova *et al.*, 1999 y Hazarika, 2003), y con la ineficiencia en la absorción y transporte de agua, debido según Martínez *et al.* (2005) a una conexión vascular incompleta o deficiente entre la raíz y el brote. Sin embargo después de 15 días se produce un incremento significativo de su valor, manteniéndose esa tendencia hasta el final de la etapa de aclimatización evaluada, y con ello se sugiere su adaptabilidad.

Finalmente el análisis de las variables indicativas del estado hídrico de las plántulas (Tabla 12), reflejan que a pesar de la disminución significativa de éstas a los 15 días del proceso de aclimatización, este decremento no constituyó una deficiencia hídrica para este cultivo, muy diferente a lo informado por Pospisilova *et al.*, 1998, en la aclimatización de plántulas de Tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1), en el que en los primeros 15 días valores de potencial hídrico inferiores a -1.0 MPa afectaron la supervivencia de las plántulas, por lo tanto este resultado sugiere que en la aclimatización de las plántulas de henequén existen otros factores que pudieran estar influyendo con mayor relevancia en la supervivencia de éstas.

En la figura 15 se aprecia el comportamiento de los indicadores de crecimiento evaluados a las plántulas, en los distintos momentos establecidos para el estudio de la fase de aclimatización. Se reflejan valores negativos para las tasas absoluta, relativa y de asimilación neta en el intervalo de 0 a 15 días, lo que indica que durante este tiempo no hubo incremento en la biomasa de las plántulas, como se puede apreciar en los valores de área foliar y masa seca total mostrados en la tabla 12. Este hecho se debe a que todo el CO₂ fijado en la fotosíntesis se consume en la respiración o que las plántulas bajo estas condiciones sobreviven a expensas de las sustancias de reserva adquiridas por ellas durante la fase *in vitro*. Ello puede ser el resultado de un comportamiento de fotoautotrofia incompleta o que hay supresión de la fotosíntesis durante este período (Kozai *et al.*, 1991; Pospisilova *et al.*, 1999 y Arigita *et al.*, 2002).

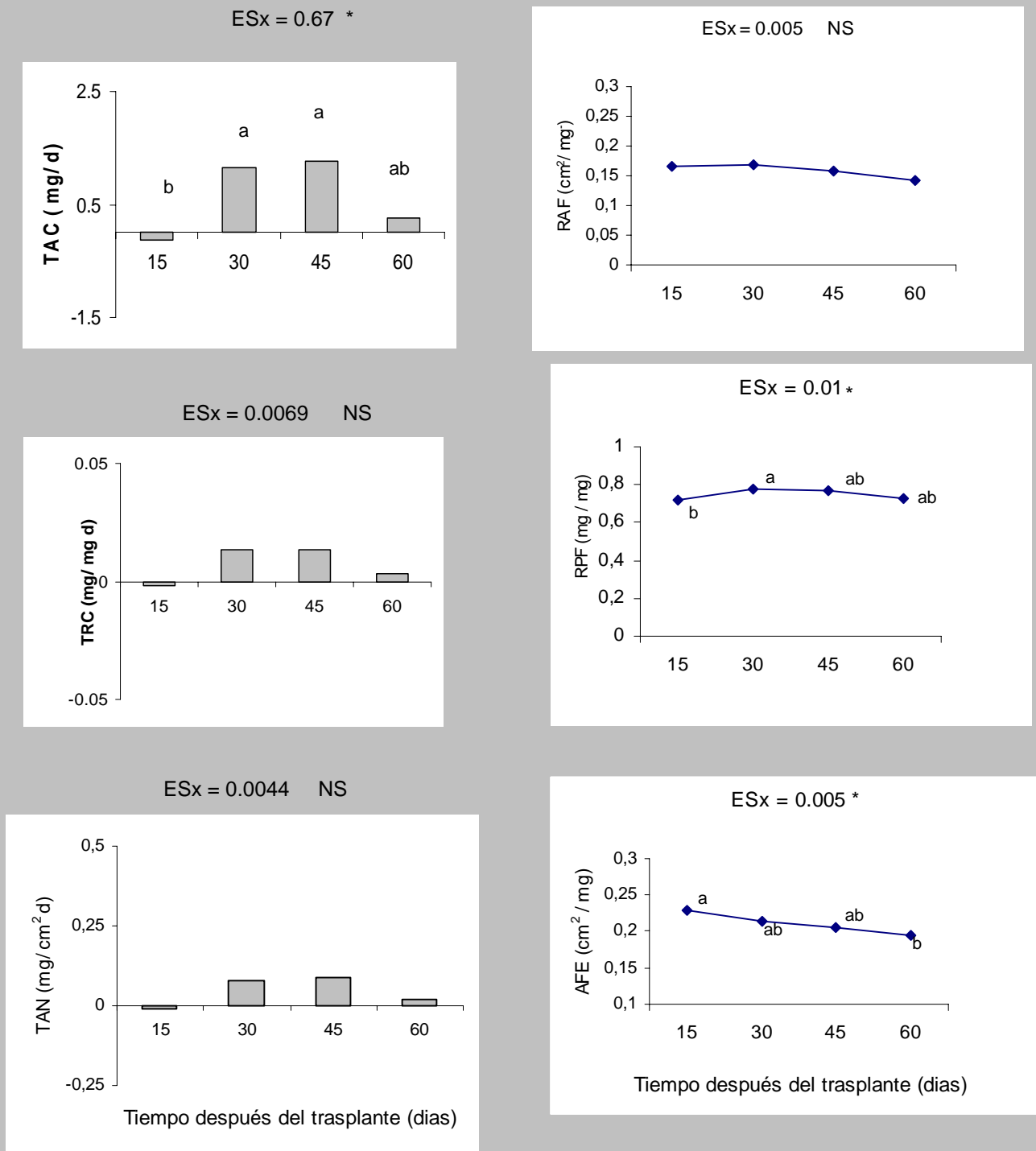


Figura 15. Comportamiento de la Tasa absoluta de crecimiento (\overline{TAC}), Tasa relativa de crecimiento (\overline{TAR}), Tasa de asimilación neta (\overline{TAN}), Relación del área foliar (\overline{RAF}), Relación del peso foliar (\overline{RPF}) y Área foliar específica (\overline{AFE}) durante la fase de aclimatización.

Tratamientos con letras diferentes difieren significativamente para $p < 0.05$.

Las reducidas tasas de crecimiento o con valores negativos presentes en las plántulas durante las primeras semanas de la aclimatización, informado por Kozai *et al.* (1991), pueden estar asociadas con las variaciones en el contenido hídrico de las plántulas como sucede en las hojas en estado de marchitez, característica usualmente visible en las plántulas después del trasplante (Torres y Mogollón, 2002). Esto produce cierto incremento de la actividad respiratoria, debido a la transformación de almidones en azúcares y por consiguiente una disminución de la masa seca. Además está demostrado que en plantas cuya tasa de crecimiento es cero, toda la respiración estará destinada a procesos de mantenimiento (Ribas-Carbó y González-Mele, 2000).

De igual forma la carencia de agua en las plantas puede influir de manera decisiva en la acumulación de biomasa o en el rendimiento de las mismas (Barroso y Jerez, 2000), siendo precisamente en este intervalo (0 - 15 días), donde más bajo se presentaron los valores de contenido relativo de agua y potencial hídrico foliar, difiriendo este último significativamente del resto de los valores obtenidos en los distintos momentos estudiados de la etapa de aclimatización.

En los períodos de 30, 45 y 60 días, todas las tasas de crecimiento se incrementan, especialmente durante el intervalo de 15 a 30 días, lo que sugiere que después de 15 días en esta fase (de acuerdo con las condiciones creadas en este estudio), comienzan a producirse cambios en la anatomía y en los mecanismos fisiológicos de estas plántulas, como respuesta a las nuevas condiciones medioambientales de las casas de aclimatización, que se pudieran asociar con el comienzo de un proceso de recuperación de estas plántulas a partir de este tiempo (15 días) y que les permite además alcanzar a partir de un período de 30 días, un comportamiento favorable de las tasas de crecimiento y del estado hídrico. Esto puede ser el resultado de una respuesta autotrófica eficiente de las plántulas a partir de este momento (30 días) y de eficiencia en los mecanismos que les permiten a las plantas hacer un control de las pérdidas de agua, asociado además a la presencia de las nuevas raíces verdaderas como ya se destacó en los experimentos anteriores. En tal sentido también se ha demostrado que la eficiencia en el uso del agua por las plantas, es una medida de la efectividad de

los estomas para maximizar la fotosíntesis reduciendo al mismo tiempo la pérdida de agua (Segura, 2003).

Después del período de 45 días, se observa una disminución aunque no significativa de las tasas de crecimiento. Esto puede asociarse a la senescencia de una hoja, que implica una disminución proporcional del área foliar y la biomasa.

Por su parte el área foliar específica refleja la existencia a los 60 días de una mayor masa seca por unidad de área foliar, difiriendo significativamente del valor mostrado a los 15 días, lo que sugiere que durante todo el período se mantuvo una tendencia a incrementar la masa seca de las hojas, lo cual puede manifestarse en un aumento del grosor, de la expansión foliar o ambos. Este hecho, conjuntamente con la condición más favorable del estado hídrico de las plántulas a los 60 días, corrobora lo expresado anteriormente con relación a las particularidades del crecimiento de las plántulas de henequén durante el período de aclimatización evaluado.

El comportamiento ulterior de las plántulas cuando fueron transferidas a condiciones de previvero, se refleja en la tabla 13 y en la figura 16.

En la estructura de las hojas de las plantas de henequén, es característico un engrosamiento de la cutícula y abundantes ceras epicuticulares, que les permiten mantener bajas tasas de transpiración por esta vía en condiciones naturales. Estos aspectos no son totalmente corregidos durante las primeras semanas de la aclimatización como resultado de su adaptación a las nuevas condiciones ambientales y parecen tener un efecto más marcado durante los primeros 15 días.

Los valores de las variables del crecimiento de las plantas a los 180 días de previvero, como se refleja en la tabla 13, no mostraron diferencias entre los tratamientos evaluados. Este comportamiento es similar al mostrado por los indicadores del crecimiento calculados, al final del período (Figura 16).

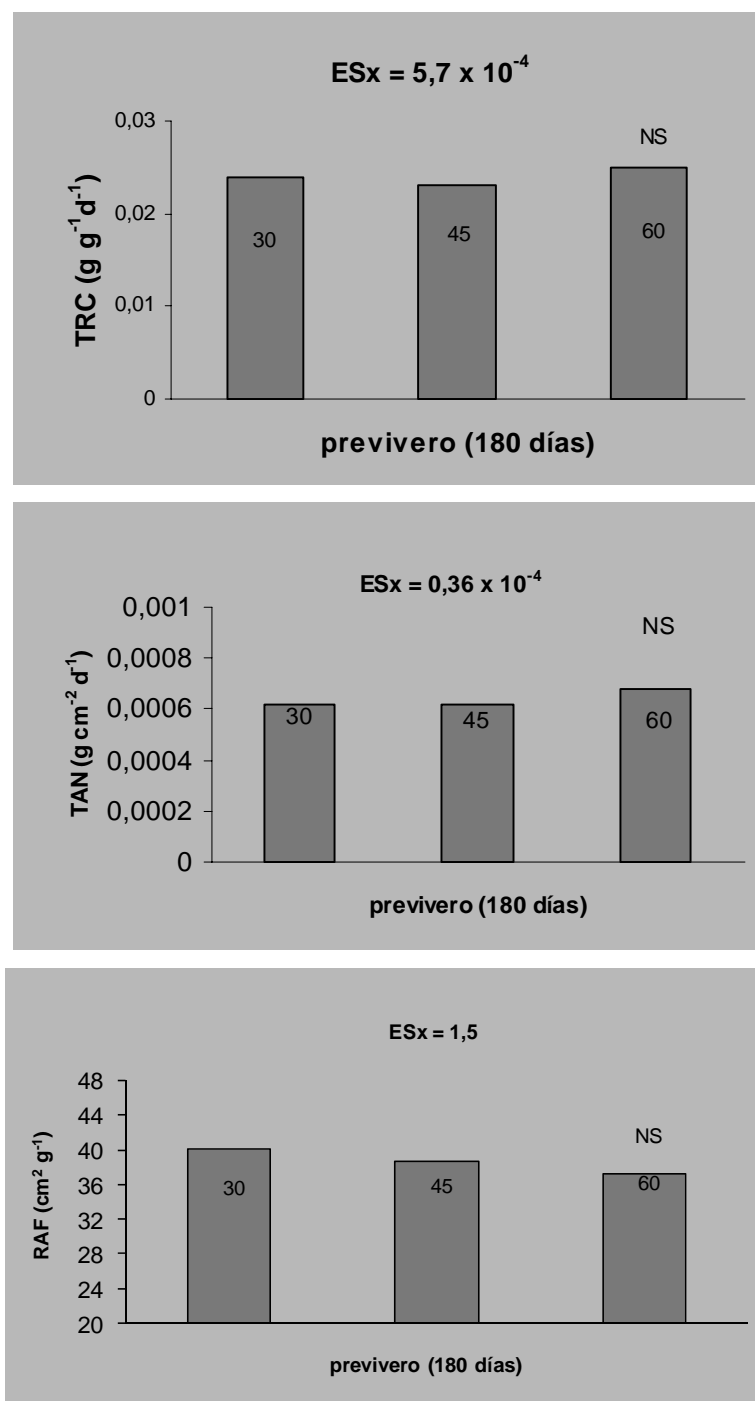


Figura 16. Comportamiento de tasa relativa de crecimiento (TRC), tasa de asimilación neta (TAN) y relación del área foliar (RAF) de las plantas durante la etapa de previvero que provenían de los períodos de 30, 45 y 60 días de aclimatización.

NS indica que no hay diferencia entre las medias ($n = 10$), para $p < 0.05$.

Tabla 13. Comportamiento de algunas variables del crecimiento en plántulas con 30, 45 y 60 días de aclimatización durante la fase de previvero a los 180 días de estancia en esta etapa.

Tratamientos (aclimatización en días)	Talla (cm)	No. hojas	Área Foliar (cm ²)	Masa seca total (g)
30	21,47	7	184	8,22
45	22,45	7	194	8,28
60	23,03	7	194	8,42
ESx	0,58 ^{NS}	0,17 ^{NS}	7,7 ^{NS}	0,47 ^{NS}

NS: Indica que no hay diferencia entre las medias (n = 10), $p < 0.05$.

Estos resultados evidencian que las plántulas de esta especie responden positivamente a partir de los 30 días de aclimatización, no sólo en relación a su comportamiento en las casas de cultivo sino también en la supervivencia y en cuanto a crecimiento y desarrollo cuando son trasladadas para los previveros, favoreciéndose además desde el punto de vista de la calidad y economía de todo el proceso.

Resulta importante resaltar además que una vez lograda la adaptación y la capacidad de las plántulas para desarrollar procesos fotosintéticos, la exposición a la luz completa en exteriores sin afectar su supervivencia, como ya se destacó en el experimento 4.4, puede ser un factor favorable para incrementar las tasas de crecimiento y desarrollo de las plántulas de acuerdo con la especie, lo que explica los resultados alcanzados en este experimento. Este es un aspecto que se debe considerar para acelerar el tránsito de las plantas por el área de aclimatización, para que una vez lograda altas tasas de supervivencia, las plántulas crezcan y se desarrollen rápidamente y de esta forma hacer más eficiente el proceso de propagación y utilizar con mayor frecuencia las instalaciones especializadas dedicadas a estos fines (Rodríguez, 2005).

4.7. Estudio del comportamiento de plántulas de henequén en condiciones de previvero, en diferentes fechas de plantación

Según los resultados mostrados en la figura 17, las plántulas establecidas en el período de Mayo a Noviembre alcanzaron los indicadores de calidad establecidos por el instructivo técnico del cultivo (Cuba MINAG, 1986) y las exigencias de los propios productores para pasar a la etapa de vivero. En el periodo de Mayo- Noviembre los indicadores tienen un comportamiento superior que difieren significativamente de los periodos Enero-Julio y Julio-Enero. Sin embargo, en estos períodos (Enero-Julio y Julio-Enero), los indicadores no tuvieron diferencias significativas entre sí y las plantas de ambos grupos alcanzaron niveles de desarrollo similares.

Este resultado evidencia una respuesta diferenciada del cultivo a las variaciones climáticas que ocurren en el país, lo que coincide con lo informado por Otero (1999) en cuanto a que el henequén de acuerdo con sus características botánicas y fisiológicas, presenta resistencia a la sequía y se desarrolla bien en climas secos. Por lo tanto cierto grado de humedad y temperaturas cálidas favorecen su crecimiento significativamente.

Según diferentes autores (Gehlsen, 1939; Schery, 1956; Kirby, 1968) citados por Otero (1999), este cultivo es muy sensible a las bajas temperaturas y por el contrario, puede soportar temperaturas atmosféricas elevadas, debido a la capacidad que presenta dicha planta de resistir la sequedad. Se plantea en este sentido (Otero, 1999), que si las temperaturas fluctúan entre 27 y 32 °C y no bajan de 16 °C el cultivo encuentra condiciones óptimas para su desarrollo, sin embargo por debajo de 10 °C su ritmo de crecimiento se retarda considerablemente.

En la tabla 14 se presentan los datos de temperaturas máximos y mínimos mensuales, así como los datos de la humedad relativa de la zona de estudio durante el período experimental. La figura 18 muestra el comportamiento de la temperatura media mensual.

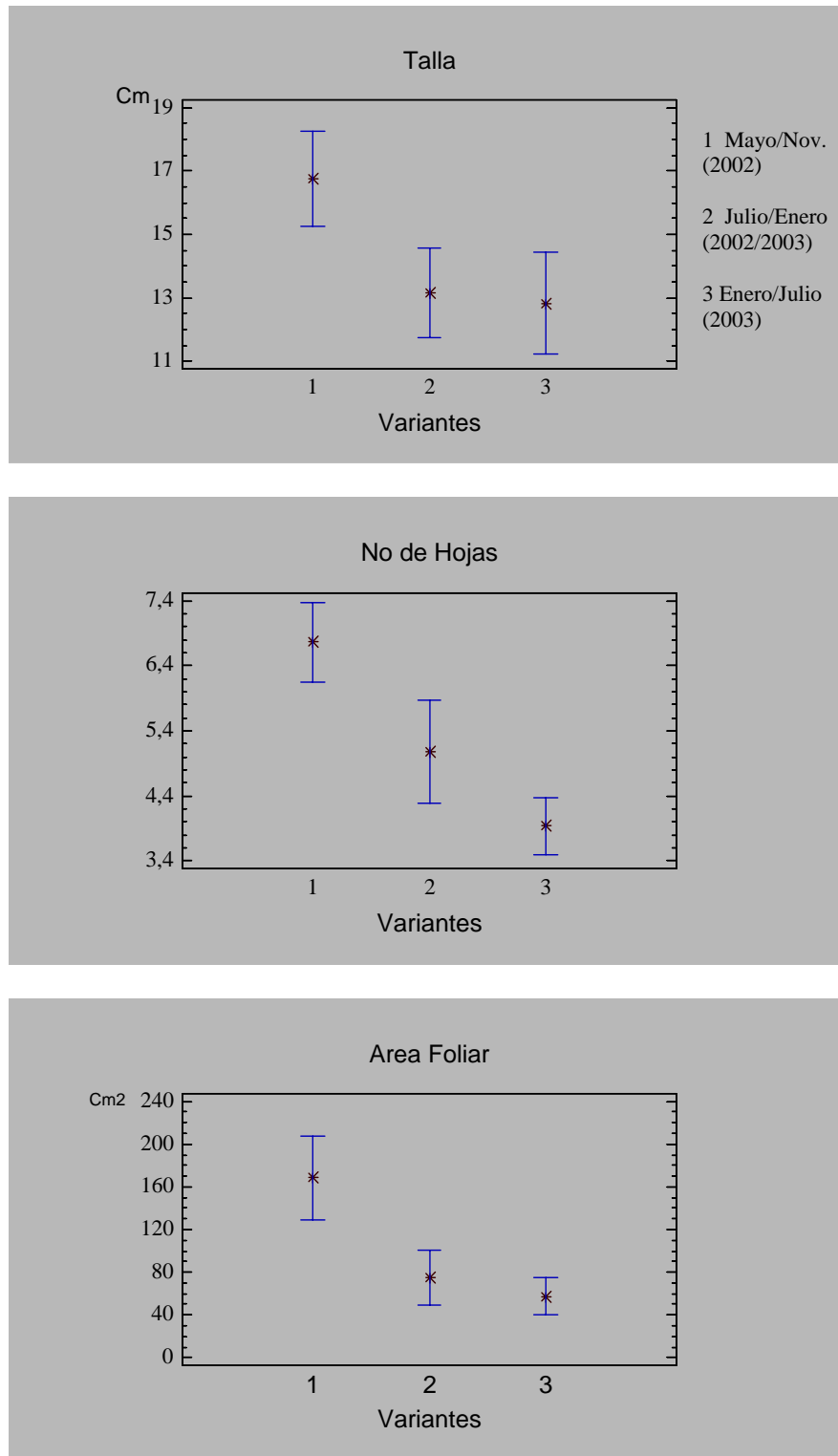


Figura 17. Intervalos de confianza de las medias de los indicadores medidos, en etapa de previvero (180 días), teniendo en cuenta tres periodos diferentes de desarrollo de las plántulas en estas condiciones. (n = 15).

Tabla 14. Principales variables climáticas de interés para el estudio, que caracterizaron el período experimental.

Período	Temperatura (°C)		Humedad Relativa (%)
	Máxima	Mínima	
2002			
Mayo	31,6	20,7	78,9
Junio	30,8	21,5	80,1
Julio	31,3	21,4	80,2
Agosto	31,5	21,6	81,4
Septiembre	31,0	21,3	82,0
Octubre	29,3	21,0	80,8
Noviembre	27,6	18,7	80,5
Diciembre	26,9	16,6	79,1
2003			
Enero	26,1	14,8	75,31
Febrero	25,7	15,7	82,72
Marzo	30,2	16,0	75,89
Abril	29,7	18,4	76,52
Mayo	30,6	17,9	76,11
Junio	30,9	21,7	82,85
Julio	32,4	21,7	80,91

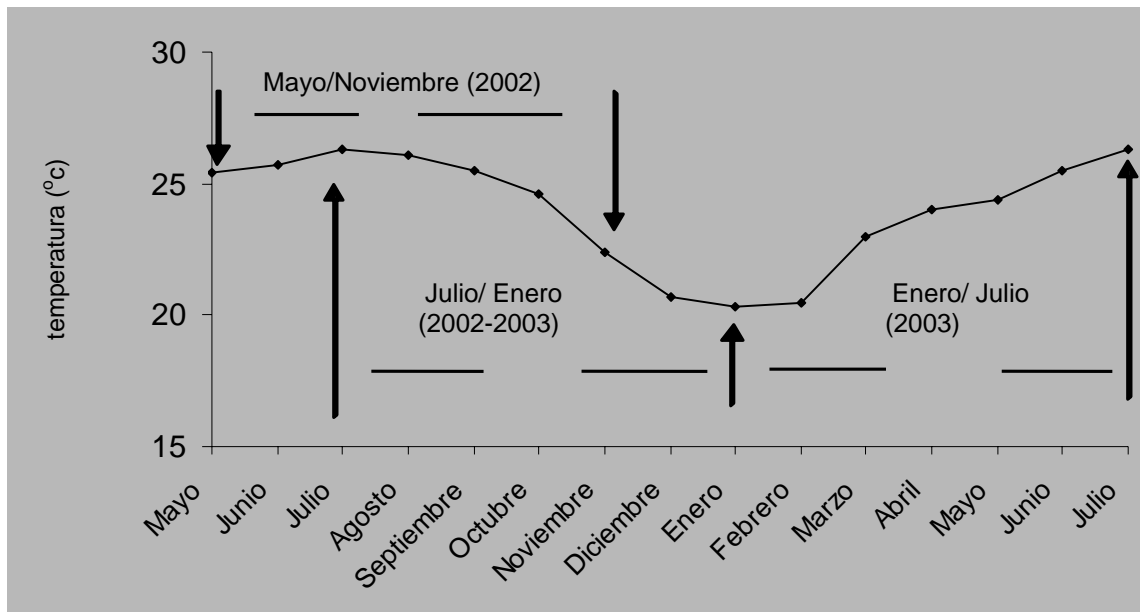


Figura 18. Comportamiento de la temperatura media mensual durante el período experimental

En los datos que aparecen en la tabla 14 y la información presentada en la figura 18, se evidencia que durante el período de mayo a noviembre las plantas recibieron desde el momento en que se trasplantaron para el previvero, el estímulo de las altas temperaturas que favorecen su desarrollo, ello concuerda con los criterios establecidos en los párrafos anteriores del efecto de la temperatura sobre el crecimiento en la primera variante. En este período las plantas recibieron la acción de las bajas temperaturas al final de su estancia (mes de noviembre), lo que sugiere un efecto menos desventajoso para éstas, dado el desarrollo que lograron alcanzar hasta ese momento.

En los períodos de Julio a Enero (2002-2003) y de Enero a Julio (2003), aunque se alcanza la talla de las plantas para vivero en 6 meses, sus valores se presentan muy inferiores a los logrados en el período de Mayo a Noviembre. Ello sugiere, en el caso de la variante de Enero a Julio, que las bajas temperaturas en la primera etapa de su traslado para el previvero, inhibieron o disminuyeron la velocidad de los procesos metabólicos, por lo que retrasaron su crecimiento.

En el caso de las plantas de la variante de Julio a Enero, aunque se produjeron en estas valores similares de crecimiento a las plantas del período de Enero a Julio, no sufrieron el efecto negativo de las bajas temperaturas en la primera etapa de su traslado a previvero. Este resultado indica que otros factores deben ejercer algún efecto que contribuye a retrasar el ritmo de crecimiento, entre ellos podrían estar las precipitaciones, interacción con los microorganismos del suelo, entre otros.

En cuanto a la época óptima para plantación en vivero, según informa Otero (1999), puede realizarse en cualquier época del año, pues este cultivo resiste la sequía y se desarrolla bien en climas cálidos, sin embargo su época óptima se corresponde con el período lluvioso, o sea con los meses más cálidos del año de acuerdo con las condiciones ecológicas de Cuba como ya se destacó antes.

De hecho se concluye que las plantas micopropagadas, aunque pueden plantarse en cualquier período, son más exigentes de condiciones de alta humedad y elevada temperatura cuando se transfieren a previvero. En esta fase las plántulas

se enfrentan al medio natural, algo similar a las condiciones de campo, etapa en que se presentan con bajo niveles de desarrollo adquirido durante el período de aclimatización, como se discutió en el experimento 4.6. (Estudio de algunos cambios anatomorfológicos y fisiológicos producidos en las plántulas durante la aclimatización).

Si el trasplante se realiza en un período en el que las plántulas quedan más expuestas a temperaturas bajas durante un mayor tiempo, se retarda significativamente su ritmo de desarrollo y ello puede afectar la etapa de vivero.

4.8. Valoración económica

Las tablas 15 y 16, reflejan que de las variantes analizadas en la fase de aclimatización, el mayor incremento de los ingresos se obtiene para el período de 30 días, fundamentalmente por ahorro de recursos, que hace que disminuya el costo de producción. Como resultado de los indicadores evaluados (Tabla 16), se observa que la ganancia a los 30 días se incrementa en \$ 1 581,1 y \$ 3 162,2, para el monto total de plantas con respecto a los 45 y 60 días respectivamente, aunque en este sentido, el costo unitario por planta no refleje altas diferencias. Por su parte la rentabilidad igualmente es superior en 3.7 % y 7.2 % para los 30 días con respecto a los otros dos períodos.

Tabla 15. Ficha de costos del proceso de aclimatización.

Gastos generales del proceso (\$)	30 días	45 días	60 días
	MN	MN	MN
Gasto de materia prima y materiales.			
▪ Posturas	42 350,00	42 350,00	42 350,00
▪ Agua	153,91	207,84	261,77
▪ Bandeja	245,34	245,34	245,34
▪ Zeolita	38,81	38,81	38,81
Energía.			
▪ Electricidad	12,21	16,39	20,57
▪ Combustible	8,00	8,00	8,00
Gasto de fuerza de trabajo.			
▪ Salario	3 609,6	4 963,2	6 316,8
Total de gastos directos	46 417,87	47 829,58	49 241,29
Gastos indirectos (%).	5 570,14	5 739,54	5 908,95
Total de gastos (directos + indirectos).	51 988,01	53 569,12	55 150,24
Producción total.(plantas)	500 000	500 000	500 000
Costo/Planta.	0.10	0.11	0.11

Precio venta = \$ 0.13

Tabla 16. Análisis de indicadores económicos.

Indicadores económicos.	UM	30 días	45 días.	60 días.	Ahorro	
					30-45	30-60
Costo de producción	\$	51 988,01	53 569,12	55 150,24	1 581,1	3 162,2
Costo/ planta	\$	0,10	0,11	0,11		
Ganancia	\$	13 011,99	11 430,88	9 849,76	1 581,1	3 162,2
Rentabilidad	%	25,02	21,33	17,85		

Con respecto al costo de la postura por el método tradicional (para ser llevada a vivero), puede variar en dependencia de las condiciones de trabajo (información aportada por la empresa), de la siguiente forma:

- Terrenos con un nivel bajo de infestación de malezas, 10 centavos, de ellos 0.01 en CUC.
- Terrenos con un nivel medio de infestación de malezas, 12 centavos, de ellos 0.01 en CUC.
- Terrenos con un nivel alto de infestación de malezas, 14 centavos, de ellos 0.01 en CUC.

En cuanto al costo medio de permanencia de la postura en vivero, por el método tradicional es de 15 centavos, de ellos 0.002 en CUC, teniendo en cuenta que estas plantas alcanzan su tamaño óptimo de plantación en un período de 16 a 18 meses. Por el método de propagación *in vitro*, el costo medio de la postura entre el previvero y el vivero, se estima que sea de 13 centavos y de ellos 0.002 en CUC. Esta postura puede alcanzar su tamaño adecuado para plantación definitiva en 12 meses.

Del análisis realizado en la fase de aclimatización, se establece que una estancia de 30 días en esta etapa, brinda mejores beneficios económicos que estancias de 45 ó 60 días, fundamentalmente por concepto de ahorros de recursos y fuerza de trabajo, lo que coincide además con lo planteado por Fontúrbel (2002) y Rodríguez (2005), en cuanto a la necesidad de realizar una transferencia cuidadosa de las plántulas a las condiciones *ex vitro* en el menor tiempo posible.

Con relación al análisis hecho en cuanto al costo de permanencia de la postura en condiciones de vivero, a pesar de que la información dada en este aspecto refleja mejor comportamiento para la postura proveniente de la micropropagación, existen también otras ventajas que se obtienen en esta especie con el empleo de las plantas micropropagadas, actualmente observables en las condiciones de la empresa de Matanzas, las que se refieren a continuación:

- Se ha podido observar una mayor emisión de hijos basales o del rizoma por año, en comparación con plantaciones de campo.

- La entrada en producción de plantaciones establecidas con este tipo de postura es a los tres años, en vez de a los cinco o seis que requieren las plantas propagadas en campo.

En tal sentido, Eastmond *et al.* (2000) informan que en plántulas de henequén, el principal efecto observado a nivel de vivero, es una mayor capacidad de ahijamiento de las líneas clonales, las cuales producen un promedio de 5,6 vástagos por año, en comparación con 1,5 producidos por las plantas de campo, lo que permite una mayor producción de hijuelos, que por el método tradicional requeriría de un vivero en mucha mayor escala para producir esta misma cantidad de vástagos.

4.9. Propuesta de manejo para la aclimatización de plántulas de henequén

El empleo exitoso de las técnicas de cultivo de tejidos para la micropropagación de especies vegetales de interés agrícola debe estar regulado por un manejo adecuado de las plántulas una vez que son transferidas desde el ambiente controlado del laboratorio a las condiciones *ex vitro*. Este proceso resulta de vital importancia para cualquier sistema de micropropagación debido a que la aclimatización es la fase en la cual se producen las mayores pérdidas del material vegetal propagado y de esta depende el éxito de la propagación *in vitro*.

Los resultados de este trabajo confirman el hecho de que las plantas responden a los estímulos ambientales modificando sus patrones de crecimiento y desarrollo.

En un primer momento, las plántulas de henequén que se propagaron en condiciones *in vitro* adquirieron las sustancias y la energía requerida para su crecimiento y desarrollo a partir del medio de cultivo. Una vez que las plántulas son transferidas a las condiciones *ex vitro* deben comenzar a adaptarse a este nuevo ambiente y comportarse como organismos autotróficos.

Por ello, brindar un ambiente apropiado, de manera gradual, en la etapa de aclimatización, conduce las plántulas de henequén a modificar el patrón de

crecimiento adquirido en las condiciones *in vitro* y que adquirieran la capacidad para vivir en condiciones naturales.

El elevado porcentaje de supervivencia que se alcanzó, evidenció que el manejo que se estableció desde la selección de las características patrones que debían tener las plántulas para ser llevadas a la aclimatización; como el cambio gradual de las condiciones ambientales, favorecieron con mayor celeridad la etapa de aclimatización.

Se señala además, que con el empleo de un sustrato con un 10 % de materia orgánica compuesto por pulpa de henequén descompuesta y zeolita, se lograron características físicas y nutricionales que permitieron alcanzar elevados porcentajes de supervivencia.

El éxito de la aclimatización se confirmó en el ensayo de previvero, pues se demostró que las plántulas con 30 días de aclimatización lograron un porcentaje de supervivencia superior al 97 %.

Sobre la base de lo antes expuesto se propone el siguiente manejo:

- Utilizar plántulas con talla de 7 cm o mayor y masa fresca superior a 0,42 g.
- Realizar la plantación en un sustrato formado por una mezcla de pulpa de henequén descompuesta con zeolita, con un 10% de materia orgánica.
- Mantener alta humedad relativa (> 90 %) durante las primeras dos semanas, aplicando una mayor frecuencia de riego de corta duración (Aproximadamente 14 riegos de forma diaria entre las 9:00 am y las 4:00 pm, con un intervalo de 30 minutos y una duración de cinco minutos) y reducir la intensidad luminosa al 30 %.
- A partir de la tercera semana incrementar la intensidad de luz a un 70 % y espaciar los riegos (Aplicar siete con un intervalo de 60 minutos y una duración de cinco minutos).

- Concluir la etapa de aclimatización a los 30 días y trasplantar las plántulas a la etapa de previvero.
- Establecer las plántulas en la fase de previvero en un sustrato conformado por pulpa de henequén descompuesta, con un marco de plantación de 10x10 cm.
- Realizar el trasplante de las plántulas de henequén a la fase de previvero al comienzo de la primavera o finales de la época de frío. Aunque este puede extenderse durante toda la primavera.

Además de los aspectos señalados anteriormente que se plantean como específicos para el cultivo del henequén, se deben tener en cuenta otros criterios que se han preestablecidos por diferentes autores en otros cultivos (Agramonte *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2005) y que fueron corroborados en los estudios realizados, los mismos son:

- Lavar cuidadosamente las plantas con agua corriente para eliminar los restos de agar de los brotes y raíces.
- Podar las raíces para facilitar el establecimiento de las plántulas en el sustrato.
- Colocar las plántulas en agua destilada antes del trasplante por un período de 10 horas.
- Sumergir en el momento de la plantación en la bandeja la parte basal y la zona de las raíces en una disolución de oxícloruro de cobre con una concentración de 14,5 g L⁻¹.

V. Conclusiones

- Bajo las condiciones de aclimatización propuesta y el empleo de plántulas con una talla mayor o igual a siete centímetros en la salida de las condiciones in vitro, unido al empleo de un sustrato donde se mezcló pulpa de henequén descompuesta + zeolita, con un 10 % de materia orgánica, se logra un nivel de supervivencia mayor al 90 %.
- La combinación de ambientes de $HR \geq 90 \%$ y FFF entre 558,74 y 686,55 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ durante los primeros 15 días y luego 80 % HR y FFF entre 1 303,37 y 1 602,04 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ otros 15 días, estimuló la formación de raíces verdaderas y el incremento del área foliar, respuestas morfogénicas que integradas justifican el aumento de la masa seca total durante los primeros 30 días de la aclimatización.
- Las manifestaciones típicas de las características estructurales en las células epidérmicas, que se acercan a las propias de las plantas crecidas en condiciones naturales, así como el comportamiento estable y favorable de los indicadores de crecimiento y del estado hídrico de las plántulas asociados a un nivel de supervivencia por encima del 90 %, indicó que se puede concluir la etapa de aclimatización a partir de los 30 días, momento a partir del cual las plántulas de henequén están listas para pasar a la etapa de previvero.
- Con la estancia de 30 días en la etapa de aclimatización se incrementó la rentabilidad en un 3,7 % y 7,2 % con respecto a 45 y 60 días respectivamente, motivado por el incremento de la ganancia dado fundamentalmente a la disminución de los costos por ahorro de recursos, fuerza de trabajo, espacio y tiempo.
- El desarrollo de las plántulas en la fase de previvero se favorece con el empleo de la pulpa de henequén descompuesta como sustrato con un marco de plantación de 10x10 cm.

- **Las condiciones climáticas con temperatura media superior a 24 °C favorecen el crecimiento y desarrollo de las plántulas de henequén en fase de previvero, por el contrario, inferiores retardan la velocidad de su crecimiento. Sin embargo la elevada supervivencia (superior al 95 %) en los períodos evaluados sugieren la posibilidad de establecer las plántulas en previvero durante todo el año.**

VI. Recomendaciones

- Utilizar la metodología que se establece para la aclimatización de plántulas de henequén, con la modificación propuesta para la fase *in vitro*.
- Utilizar el sistema de multiplicación acelerada por cultivo *in vitro*, junto con la tecnología propuesta para la aclimatización de plántulas de henequén con el fin de apoyar el programa de desarrollo henequenero, debido a la necesidad de sustitución de importaciones (fibras).

REFERENCIAS.

- Agramonte P., D.; Jiménez T., F.; Dita R., M. A. (1998). Aclimatización. En: Pérez Ponce, J. N. (ed). Propagación y Mejora de plantas por biotecnología. Geo. Instituto de biotecnología de las plantas. Santa Clara. Cuba. pp 193 – 205.
- Aguilar, M. L.; Espadas, F. L.; Coello, J.; Maust, B E.; Trejo, C.; Robert, M L.; Santamaría, J M. (2000).The role of abscisic acid in controlling leaf water loss, survival and growth of micropropagated *Tagetes erecta* plants when transferred directly to the field, *Journal of Experimental Botany*, 51 (352): 1861-1866.
- Aragón, C.; Escalona, M.; Capote, I.; Pina, D.; Cejas, I.; Rodríguez, R.; Noceda, C.; Sandoval, J.; Roels, S.; Debergh, P.; González- Olmedo, J L. (2006).Importancia metabólica del almidón en la aclimatación de plantas de plátano ' CENSA 3/4' (AAB). *Infomusa*. 15 (1-2): 32- 35.
- Arigita, L; González, A. y Sanchez T, R. (2002). Influence of CO₂ and sucrose on photosynthesis and transpiration of *Actinidia deliciosa* explants cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*. 115: p. 166.
- Ball, V. (1998). Media mixes. En: Ball, V. (ed). *Ball Redbook Publishing*. pp 802.
- Barra A., A.G. y Mogollón M., N.J. (2007). Aclimatización de vitroplantas de *Etilingera hemisphaerica* 'Red Tulip'. *Rev. Fav. Agron. (LUZ)*, 24 Supl. (1): 32-38.
- Barroso, L. y Jerez, E. (2000). Comportamiento de las Relaciones Hídricas en la Albahaca Blanca (*Ocimum basilicum* L.) al ser irrigada con diferentes volúmenes de agua. *Cultivos Tropicales*. 21 (3): 57- 59.
- Barrs, H.D. (1968). Determination of water deficits in plant tissues. En: *Water Deficits and Plant Growth* (Kozlowskis T.T. ed.) Vol. I. Academic Press, New York. pp 236 - 368.

- Beadle, C.L. (1993). Growth analysis. En: Photosynthesis and production in a Changing Environment (Hall D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhar-Nordentrampf H.R., Leegood R.C. and Long S.P. eds.). Chapman & Hall, London. pp. 36-45.
- Binh, L. T.; Muoi, L. T.; Oanh, H. T. K.; Thang, T. D. Y Phong, D. T. (1990). Rapid propagation of *agave* by *in vitro* tissue culture. Plant cell, tissue and Organ culture. 23: 67 – 70.
- Bolar, J. P.; Noreli, J. L.; Aldwinckle, H. S.; Hanke, V. (1998). An efficient method for rooting acclimation of micropropagate apple cultivar. Hort Science. 37: 1251- 1252.
- Bortolotti Da Silva, A.; Pasqual, M.; De Rezende Maciel, Anna Lygia.; Ferreira D, L. (2003). Bap And Substrates On Gloxinia (*Sinningia Speciosa* Lood. Hiern.) Plantlets From Tissue Culture Acclimatization. Ciênc. agrotec., Lavras. 27 (2): 255-260.
- Brainerd, K. E.; Fuchigami, H. L. (1981). Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci.106: 515-518.
- Brainerd, K. E.; Fuchigami, H. L. (1992). Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA and CO₂ J. Exp. Bot. 33: 388- 392.
- Cappellades, M.; Lemeur, R.; Debergh, P. C. (1991). Effect of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 25:21-26.
- Carranca, H.(s.a.). La industrialización del henequén en Yucatán. Banco de México, 47: 61-62.
- Carrión, M. (1988). El henequén como planta productora de fibra dura. Boletín 15: 7- 29.

- Carvalho, L. C.; M. L. Osorio; M. M. Chaves; S. Amancio. (2001). Chlorophyll Fluorescence as an indicator of photosynthesis functioning of *in vitro* grapevine and plantlets under *ex vitro* acclimatization. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 67: 271-280.
- Casas, A.; Pickersgill, B.; Caballero, J. y Valiente-Banuet, A. (1997). Ethnobotany and domestication in Xoconochtli, *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) in the Tehuacan Valley and a Mixteca Baja México. *Economic Botany*. 51: 279-292.
- Chu, I. Y. E. (1992). Perspectiva of micropropagation industry. In: Kutwa K and Kozai, T. P (eds). *Transplant Production Systems*. pp 137-150.
- Chu, I. Y. E. (1992). Perspectiva of micropropagation industry. In: Kutwa K and Kozai, T. P (eds) *Transplant Production Systems*. Pp 137-150.
- Ciaramello, D. (1975) Estudio comparativo entre especies de *Agave*. *Bragantia*. 34. 1: 20-25.
- Colunga, P.S. (1996). Origen, variación y tendencias evolutivas del Henequén (*Agave fourcroydes* Lem). Capítulo 1. Tesis presentada para obtener el grado Científico de Doctora en Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. 9 p.
- Colunga, P.S. (1998). Origen, variación y tendencias evolutivas del Henequén (*Agave fourcroydes* Lem). *Bot. Soc. Bot. México* 62.
- Companioni, B.; Rodríguez, R.; Rodríguez, Y.; Borrás, O.; Pérez, M. C.; Becker, R. (1998). Influencia de la esterilización parcial del sustrato y de su combinación con *Trichoderma viride* en la fase de adaptación de *Syngonium* sp. *Cuadernos de Fitopatología*. 15 (58): 135-137.
- Cuba. INRA. Dirección nacional de fibras. (1975). Introducción a la tecnología del desfibrado del henequén. Informe. 24 p.
- Cuba. MINAG. (1986). Dirección de Cultivos Varios. Instructivo técnico del cultivo del henequén. La Habana: MINAG. 37 p.

- Cushman, J. C. (2001). Crassulacean Acid Metabolism. A Plastic Photosynthetic Adaptation to Arid Environments. *Plant Physiology*. 127: 1439 – 1448 p.
- Dahlgren, R.M.T; Clifford, H.T; Yeo, P.H. (1985). The family of the monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy – Springer-Verlag. pp 177 – 186.
- Dami, L; Hughes, H.G. (1995). Leaf anatomic and water loss of in vitro PEG-Treated “Valliant” grape. *Plant cell tissue and organ culture*. 42: 179-184.
- Debergh, P. C. (1991). Acclimatization technique of plants from *in vitro*. *Acta Horticulturae*. 289: 291-300.
- Debergh, P. y Maene, L.J. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scient Hort* 14: 335- 345.
- Debergh, P. C.; Zimmerman, R. H. (1991). Micropropagation, technology and application. En: Debergh P.C; R. H. Zimmerman (eds). *Micropropagation*. pp. 45-69.
- Debergh, P. C.; De Meester, J.; De Rieck, J.; Jillis, S.; Van Huylembroeck, J. (1992) Ecological and physiological aspects of tissue-cultured plants. *Acta Bot. Neerl.* 41 (4): 417- 423.
- De Faz, A., De Cossio, F. (1983). Lucha contra las enfermedades. Los Fungicidas. En: *Principios de Protección de Plantas*. Ed. Científico Técnica. Instituto superior de Ciencias Agrícola de la Habana. Cuba. pp. 211 – 222.
- De Fréitez, Y .H. y Páez, J. (2004). Anatomía foliar comparada de plantas de Jengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) cultivadas en tres ambientes de crecimiento. *Bioagro*. 16 (1): 27-30.
- De La Fe, C. F.; R. Ortiz.; M. Jiménez. (1998). Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. II. Efecto de

- análogos de brasinoesteroides en la multiplicación, el enraizamiento y la adaptación de las vitroplantas *Cultivos Tropicales* 19 (3): 45-48.
- Deng, R.; R. Danielle; J. Donnelly. (1993). *In vitro* hardening of red raspberry through CO₂ enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. *Can. J. Plant. Sci.* 73: 1105 – 1113.
- De Rieck, J.; Van Cleemput, O.; Debergh, P. C. (1991). Carbon metabolism of micropropagated *Rosa multiflora* L. *In vitro Cell Devel. Biol.* 27: 57-63.
- Desjardins, Y. (1995a). Factors affecting CO₂ in striving to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 1 (1): 13 –21.
- Desjardins, Y. (1995b). Photosynthesis *in vitro* on the factors regulating CO₂ assimilation in micropropagation systems. *Acta Horticulturae.* 39: 345-353.
- Desjardins, Y.; Laforge, F.; Lussier, C.; Gosselin, A. (1988). Effect of CO₂ enrichment and high photosynthetic Photon flux on the development of autotrophy and growth of tissue culture strawberry, raspberry and asparagus plants. *Acta Horticulturae.* 230: 45- 53.
- Diez, J. y Gil, L. (1999). "Culturing of cell tissues within the Spanish breeding programme against Dutchelm disease". In: *Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99.* Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp.307-311.
- Dodd, A N.; Borland, A M.; Haslam, R P.; Griffiths, H.; Maxwell, K. (2002) Crassulacean acid metabolism: Plastic, fantastic, *Journal of Experimental Botany.* 53 (369): 569- 580.
- Donnelly, D. J.; Vidaver, E. W.; Lee, K. (1985). The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 4: 43-50.

- Eastmond, A; Herrera, J. L; Robert, M. L. (2000). La biotecnología aplicada al Henequén: Alternativas para el futuro. Centro de Investigaciones Científica de Yucatán. México. 106 p.
- Enríquez del V, R.: Díaz, B.; de la Cruz, A.; Santibáñez M, T. (1988). Enraizamiento *in vitro* de brotes de *Agave potatorum*. Resúmenes del XII Congreso de Citogenética. Chapingo. Mexico.
- Enríquez del V R, Carrillo G, Sánchez P, Rodríguez M de las Nieves, Mendoza M del Carmen. (2000). Fertilización para la Óptima Adaptación Y Vigor de Plantas de Tomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*) Obtenidos *in vitro*. Fitotecnia Mexicana.23: 59 – 68.
- Enríquez del V, R. y Díaz, B. (1994). Experiencias sobre propagación *in vitro* de plantas. Centro de micropropagación de especies vegetales. Cuadernos de los centros N^o 1. pp 11 – 14.
- Esau, K. (1985). Anatomía Vegetal. Ed. OMEGA. Barcelona. 780 pp.
- Escandón, A.S.; Ferrari, P.; Facciuto, G.; Soto, S.; Hagiwara, J.C.; Acevedo, A. (2003). Combinación de Técnicas *in vitro* y *ex vitro* para la Micropropagación de Santa Rita (Hibr.) Una Arbustiva de Relevancia Ornamental, RIA. 32 (1): 111-122.
- Etienne, H.; Solano, W.; Pereira, A.; Bertrnd, B.; Berthouly, M. (1997). Coffea *in vitro* plantlets acclimatization protocols. Plantations, Rech. Devel. 4:304-311.
- Expósito, L.; Hidalgo, M.; Domínguez, Q.; Borroto, C. G.; González, R. (1993). Determinación de sustrato óptimo para la inoculación de Micorrizas Vesículas-Arbuscular (MVA) en vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L) Merr) cv. Cayena lisa. Memorias del 1^{er} Simposio Latinoamericano de Piñicultura, Cali, Colombia. pp. 25-29.

- Favaro, J C.; Buyatti, M A.; Acosta, M R. (2002). Evaluación de sustratos a base de serrín de Salicáceas (*Salix sp.*)compostados para la producción de plantones. *Investigación Agraria*. 17 (3): 367- 373.
- FAO. (1970). Fabricación y uso de la placa de yeso reforzada con sisal. Serie de investigaciones sobre fibras duras. 7: 1-3.
- Ferwerda P., F y Wit, F. (1987). Sistemática y relaciones botánicas. En: Genotecnia de cultivos tropicales perennes. Editorial AGT, México. pp. 3- 20.
- Fontúrbel, F. (2002). Micropropagación de un cultivo perenne. *Portal de Biología y Ciencias de la Salud*. 7: 1 – 8.
- Frampton, L. J.; Amerson H. V.; Leach G. N (1998). Tissue culture method affects *ex vitro*, growth and development of loblolly pine. *New Forests*.16: 125-138.
- Garriga, M., González, G., Alemán, S. (2006). Comportamiento *in vitro* de la formación de brotes axilares en *Agave fourcroydes* Lem. *Biotecnología Vegetal*. 6 (1): 3-7.
- Gitman, E. (2001). “Fundamentos de administración financiera”. Ed. Octava, EMPES, Cuba.
- González, A.M. Morfología de Plantas Vasculares. On-line <http://www.biologia.edu.ar/botanica/>. Consulta Enero 2006.
- González, G. (2001). Embriogénesis somática en henequén (*Agave fourcroydes* Lem) Tesis presentada en opción al grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas Universidad de Matanzas. 114p.
- González, G.; Alemán, Silvia.; Barredo, F.; Keb, M.; Ortiz, R.; Abreu, E.; Robert., M.L. (2004). Una alternativa dela recuperacion henequenera de Cuba, mediante el uso de tecnicas biotecnologicas y moleculares. *Biotecnología Aplicada*. 21(1): 44-49.

- González G; Alemán Silvia; Trujillo R; Roberto Domech; Enildo Abreu y Yunel Pérez. (2002). Influencia del 6 Benziladenina sobre el comportamiento in vitro de plantas de henequén obtenidas a partir de embriones. *Biotecnología Vegetal* 2 (4): 235-238.
- González, G.; Trujillo, R.; Darías, R.; Peñas, Esperanza. (1997). Micropropagación del Henequén: Aportes a una tecnología. 17: 177 – 180.
- González, J.; Rodríguez, R.; Rodríguez, Y.; Yanez, E.; Escalona, M. (1999). Caracterización de las condiciones de cultivo *in vitro* y la aclimatización de plántulas de Piña y Caña de Azúcar. Libro de Reportes Cortos, V Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. pp. 174-176.
- González, R.; Domínguez, Q.; Expósito, L. A.; González, J. L.; Martínez, T.; Hidalgo, M. (1995). Efectividad de ocho cepas de *Azotobacter* sp. en la adaptación de vitroplantas de piña cv. Cayena lisa. *Centro Agrícola*. 22 (3): 68-75.
- Grout, B W; Aston, H. (1977). Transplanting of cauliflower regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Rev.* 17: 1-7.
- Grout, B W.; Donkin, E. M. (1987). Photosynthetic activity of cauliflower meristem culture *in vitro* and at transplanting into soil. *Acta Horticulturae*. 212: 323-327.
- Hartmann, H. T.; Kester, D. E.; Davies, F. T.; Geneve, R. L. (1997). *Plant Propagation. Principles and Practices*. Sixth Edition, Prentice Hall Upper Saddle River. pp. 425.
- Hazarika, B. N. (2003). Acclimatization of tissue-cultured plants, *Current Science*. 85 (25): 1704-1712.

- Heo, J. W.; Kubota, C.; Kozai, T. (1996). Effects of CO₂ concentration, PPF and sucrose concentration on *Cymbidium* plantlet growth *in vitro*. *Acta Horticulturae*. 440: 559–566.
- Infante, D.; González, G.; Peraza, L.; Keb-Llanes, M. (2003). Asexual genetic variability in Agave. *Plant Science*. 164 (2): 223-230.
- Izquierdo, H.; Quiñones, Y.; Disotuar, Rosalina.; Pedroso, Dolores. (2002). Evaluación de diferentes sustratos en la aclimatización de vitroplantas y microbulbillos de ajo (*Allium sativum* L.). *Cultivos Tropicales*. 23 (3): 63- 69.
- Jeong, B. R.; Fujiwara, K.; Kozai, T. (1995). Environmental control and photoautotrophic micropropagation. *Hort. Rev.* 17: 123-170.
- Julca-Otiniano, A.; Solano-Arrue, W. Y R. Crespo-Costa, R. (2002). Crecimiento de *Coffea arabica* variedad Caturra amarillo en almácigos con sustratos orgánicos en Chanchamayo, Selva central del Perú. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 17 (3): 353- 365.
- Keb L, M.; González, G.; Bartolome Chi, M. and Infante, D. (2002). A rapid and simple method for small-scale DNA extraction agavaceae and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 1-5, September.
- Kirdmanee C.; C. Kitaya; T. Kozai. (1994). Rapid acclimatization of *in vitro* plantlets by controlling photosynthetic photon flux density and relative humidity *ex vitro*. In: T. Kozai; Y. Kitaya; C. Kubota. (eds). *Collected papers on environmental control in micropropagation*. Editorial Gemhua Niu. 3: 957-958.
- Kirdmanee, C.; Kitaya, Y.; Kozai, T. (1995a). Effects of CO₂ enrichment and supporting material *in vitro* on photoautotrophic growth of *Eucalyptus* plantlets *in vitro* and *ex vitro*. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 31: 144-149.

- Kirdmanee, C.; Kitaya, Y.; Kozai, T. (1995b) Rapid Acclimatization of Eucalyptus plantlets by controlling photosynthetic photon flux density and relative humidity. *Environmental Control in Biology*. 33 (2): 123-132.
- Kozai, T. (1991) Acclimatization of micropropagated plants. En: P. S. Bajaj (ed). *Biotechnology in Agriculture and Forestry, High Tech. and Micropropagation I*, Springer Verlag pp. 157-171.
- Kozai, T.; Fujiwara, K.; Giacomelly, G. (1991). Environmental control in micropropagation . *Ann. Amer. Soc. Agr. Eng. Meeting*. 9: 11-13.
- Kozai, T.; Fujiwara, K.; Hayashi, M.; Aitken-Christie, J. (1992). The *in vitro* environment and its control in micropropagation. En: Kurata, T.; T. Kozai (eds). *Transplant Production Systems*, Kluwers Academic Publishers. 36 p.
- Kozai, T.; Iwanami, Y. (1988). Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plantlet growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science*, 57: 279-88.
- Kozai, T.; Kitaya, Y.; Fujiwara, K.; Smith, M. A. L.; Aitken-Christie, J. (1995a) Environmental measurement and control systems. En: Aitken-Christie, J.; T. Kozai; M. L. Smith (eds). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, Kluwers Academic Publishers. pp. 539-574.
- Kozai, T.; Kitaya, Y.; Fujiwara, K.; Debergh, J. A. (1995b) Environmental control for large scale production of *in vitro* plantlets. En: M. Terzi; R. Cella; A. Falavigna (eds). *Current Issues in Plant Molecular And Cellular Biology*. pp. 659-667.
- Luttge, U. (2004). Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Annals of Botany*. 93 (6): 629 – 652.

- Macía, M J. (2006). Las plantas de fibra. En: M. Moraes R., B. Ollgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius y H. Balslev. Botánica Económica de los Andes Centrales. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. pp 370-384.
- Madrigal L., R. y Pineda E, F. (1986). Propagación *in vitro* de Agave. Programas y Resúmenes XI Congreso Nacional de Citogenética. pp 5.
- Madrigal L., R.; Pineda E., F.; Rodríguez de la O JL. (1990). Agave. Handbook of Plant Cell Cultura. Philip V. Ammirato, David A. Evans. William R. Sharp and Yashpal P.S. Bajaj. Vol. 5: Ornamental Species. MacGraw-Hill Publishing Co., New York. pp 206- 227.
- Majada, J. P.; Tadeo, F.; Fal, M. A.; Sanchez- Tames, R. (2000). Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 63: 207- 214.
- Malda, G.; Backhaus, R. y Martin, C. (2000). Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of In vitro cultured. Plant cell. Tissue and organ culture. 58: 1– 9.
- Malda, G.; Susán, H. y Backhaus, R. (1999). *In vitro* cultura as a potencial method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. Scientia Horticulturae 81: 71 – 87.
- Marinucci, L.; Ruscitti, M.; Nuñez, M.; Abedini, W.; Sharri, S. (2002). Influencia de diferentes sustratos en la aclimatización de vitroplantas de *Pelargonium graveolens* L´ Herit. V Simposio Argentino de biotecnología vegetal. Pp 1-2.
- Martínez R, R.; Azpíroz R, R H.; Rodríguez De La O, J L.; Cetina A, V M.; Gutiérrez E, M A. (2005). Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* S.T. BLAKE Y *Eucalyptus grandis* HILL EX MAIDEN. Ra Ximhai, Universidad Autónoma Indígena de México. 1 (3):.591- 597.
- Mayea s, Sergio y Herrera I, L. (1994). Fitopatología General. (Ed) Felix Varela. La Habana. 153 pp.

- Mcclelland, M. T.; Smith, M. A.; Carothers, Z. B. (1990). The effects of *in vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in tree woody plants. *Plan Cell Tissue and Organ Culture*. 23: 115-123.
- Murashige, T. (1974). Manipulation of Organ Initiation in Plant Tissue Culture. *Botanical Bulletin of Academic Sinica*. 18: 1- 24.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962) A revised médium for rapid growth and biassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 15: 473 – 497.
- Murphy, K.P.; Santamaria. J.M.; Davies, W.J.; Lumsden, P.J. (1998). Ventilation of culture vessels: I. Increased growth *in vitro* and survival *ex vitro* of *Delphinium*. *Journal of Horticultural Science*. 73 (6): 725-729.
- Ortiz P., R. (2000). Factores que afectan el desarrollo de vitroplantas de caña de azúcar en la fase adaptativa. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba. 61p.
- Ortiz P., R. (1999). Factores que afectan el desarrollo de vitroplantas en la fase *in vivo*. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas de Cuba. 30 p.
- Ortiz P., R.; De la Fé, C. y Lara, D. (1998a). Aportes a la tecnología de la micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. I. Sustratos más eficientes para la adaptación de vitroplantas. *Cultivos Tropicales*. 19(2):45-50.
- Ortiz, R.; C. De La Fé.; D. Lara. (1998 b). Aportes a la tecnología de micropropagación de la caña de azúcar aplicada en Cuba. III. Uso de fertilizantes y manejos de las vitroplantas en la fase de adaptación. *Cultivos Tropicales* 19 (3): 49-53.
- Ortiz, R.; Paneque, V.; González, G.; Caballero, M. y Abreu, E. (2000). Potencialidades nutritivas de la pulpa de henequén para su uso en la micropropagación de henequén. En: I Simposio Internacional de Fibras Naturales. Universidad de Matanzas. Libro Resúmenes. pp. 29.

- Otero B., R. (1999). El cultivo del henequén (*Agave fourcroydes*, Lem) como planta textil y su aprovechamiento integral. Temas de Ciencia y Tecnología. 3 (9): 23 - 46.
- Otero B., R.; Caridad Valdez torres; Igarza. S, A.; Zoraida Rodríguez Machado (2000). Efecto de la norma e intervalo de riego en el crecimiento y desarrollo del henequén (*Agave fourcroydes*, Lem). Temas de Ciencia y Tecnología. 4 (11): 45 – 47.
- Paneque, V. M. (1998). Abonos orgánicos. Conceptos prácticos para su evaluación y aplicación. Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba. 29 p.
- Paneque P.,V. M.; Calderón V., M.; Calaña N., J. M.; Caruncho C., M.; Hernández P., Y.; Borges B., Y. (1999). Manual de Técnicas Analíticas para Análisis de Suelo, Foliar, Abonos Orgánicos y Fertilizantes Químicos. La Habana Ediciones. 92 p.
- Peña, Esperanza.; González, G.; Berrillo, A.; Sosa, D.; Arteaga, M.; Rittoles, D.; Pérez, D.; Torriente, Z. (1997). Tecnología para la micropropagación del Henequén a gran escala. Rev. Jardín Botánico Nacional. 18: 169-176.
- Piven, N.; Barredo, F.; Borges, I.; Herrera, M.; Mayo, A.; Herrera, L.; Robert, M. (2001) Reproductive biology of henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave Angustifolia* (Agavaceae). i. Gametophyte development American Journal of Botany. 88:1966-1976.
- Pospisilova, J.; Catky, J.; Sesták, Z. (1997). Photosynthesis in plant cultivate *in vitro*. En: Pessraki, M (ed). Hanbook of Photosynthesis. Pp 525-540.
- Pospisilova, J.; Haisel, D.; Synková, H.; Catsky, J.; Wilhermová, N.; Plzaková, S.; Prochazková, D.; Sramek, F (2000). Photosynthetic pigments and gas exchange during ex vitro acclimatitation of tobacco plants as affected by Co₂ supply and abscisic acid. Plant cell, tissue and Organ Culture. 61: 125- 133 .

- Pospisilova, J.; Solarova, J.; y Catsky, J. (1992). Photosynthetic responses to stresses during *in vitro* cultivation. *Photosynthetica*, 26: 3-18.
- Pospisilova, J.; Ticha, I.; Kadlecek, P.; Haisel, D. Y Plzakova. (1999). Acclimatization of micropropagate plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*. 42 (4): 481- 497.
- Pospisilova, J.; Wilhelmová, N.; Synková, H.; Catky, D.; Tichá, I.; Hanackovaa, B.; Snopek, J. (1998): Acclimatation of tobacco plantlets to *ex vitro* condicions as affected by application of abscisic acid. *Journal of Esperimental Botany*. 49 (322): 863-869.
- Preece, J. E.; Sutter, G. E. (1991) Acclimatization in micropropagated plants to the greenhouse and field. En: Debergh, P. C.; R. H. Zimmerman (eds.). *Micropropagation*. Kluwer Academic publishers. pp 71-93.
- .Ribas-Carbó, M. y González-Mele, M. A. (2000). Fisiología de la Respiración de las Plantas. En: J. Azcón- Bieto y M. Talón. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ed. Mcgraw- Hill. Interamericana, p. 217- 234.
- Robert, M.L.; Herrera, J.L.; Contreras, F.; Scorer, K N. (1987). *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 8 : 37 – 48.
- Robert, M.L.; Herrera, J.L.; Chan, J.L.; Contreras, F. (1992): Micropropagation of *Agave spp.* J:P:Y: Bajaj (ed) *Biotechnology in Agricuclture and Forestry*. Springer-Verlag. 19: 306 -329.
- Robert, M.L.; Ortiz, R.. y Herrera, J.L. (1999). *In vitro* and *ex vitro* weaning: A key factor for field performance of micropropagate henequen (*Agave fourcroydes* Lem). En A. Cassals. *Methods and markers for Quality assurance in micropropagation*. Ed. University College, Cork Ireland.
- Rodríguez, R. (2005). Aclimatización de Plántulas de Caña de Azúcar (*Saccharum* sp, híbrido) Propagadas en Biorreactores de Inmersión Temporal. Tesis

- presentada en opción al grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplantas. Universidad de Ciego de Ávila, 95 p.
- Rodríguez N, A. Y Col. (2007). Manual Técnico para Organopónicos, Huertos Intensivos y Organoponía semiprotegida. Sexta Edición, pp 19 – 27.
- Rodríguez, R.; González., J L. Y Velazquez., N. (1998). Empleo de reguladores del crecimiento en vitroplantas y estacas de *Ixora coccinea*. L. Cultivar Guillermina. Agrícola Vergel 51: 501-502.
- Rodríguez G, H.; Hechevarría S, I.; Rodríguez F, C A.; Rivera A, M M, (2003) Propagación *in vitro* de *Artemisia absinthium* L. en Cuba, Rev Cubana Plant Med, no. 1.
- Rodríguez, Maritza; Rodríguez, Yania; Cid, Mariela y González, J. (2000) Acclimatización de vitroplantas de caña de azúcar (*Saccharum sp.* Híbrido) provenientes de sistemas de inmersión temporal. Cultivo Tropicales 21(3): 51-56.
- Rogalski, M.; Antunes de Moraes, L K.; Felisbino, C.; Crestani, L.; Guerra, M P.; Lima da Silva. (2003). Acclimatization of micropropagated *Prunus sp.* rootstocks. Rev. Bras. Frutic..25 (2).
- Ross-Karstens, G. S.; Ebert, G.; Ludders, P. (1998) Influence of *in vitro* growth conditions on stomatal density, index and aperture of grape, coffee and banana plantlets. Plant Tissue Culture and Biotechnology. 4(1): 21-27.
- Rubber, N. V. (1960). Cultura y desarrollo del cultivo del Henequén. Informe al MINSAP. Dirección de Desarrollo. 11p.
- Ruscitti, M.; Marinucci, L.; Nuñez, M.; Abedini, W.; Sharri, S. (2002). Enraizamiento *in vivo* e *in vitro* de *Pelargonium graveolens* L' Herit. V Simposio Argentino de biotecnología vegetal. Pp 1-2.

- Sánchez-Díaz, M y Aguirreolea, J. (2000). El agua en la planta. En. J. Azcón- Bieto y M. Talón Fundamento de Fisiología Vegetal. Ed. Mcgraw- Hill. Interamericana, p. 17- 30.
- Salisbury, F. B. y Ross, C. W. (1994). Síntomas de deficiencia de nutrimentos y funciones de los elementos. En: Fisiología Vegetal. (Ed) Iberoamérica. Pp 141 – 148.
- Sallanon, H.; Tort, M.; Coudret, A. (1993). The ultrastructure of micropropagate and green house rose plant stomata. Plan cell, Tissue and Organ Culture. 32: 227-233.
- Santamaria JM, Davies WJ, Atkinson CJ. (1993). Stomata of micropropagated Delphinium plants respond to ABA, CO₂, light and water potential, but fail to close fully. Journal of experimental Botany 44: 99–107.
- Santamaría, J.M.; Robert, M.L.; Herrera, J.L. (1995). Stomatal Physiology of Micropropagated CAM plant; *Agave tequiliana* (Wever). Plant Growth Regulation. 16: 211-214.
- Santana, N.; S. Cortez; Martin, J. V.; Montes, S. (1996). Adaptación de vitroplantas de embriones somáticos de café (*Coffea arabica* L.) variedad Catimor (9722). Cultivos Tropicales 17(2): 83-85.
- Scholander, P. F.; Hammel, H.T.; Bradstreet, E. D.; Hemmingsen, E. A. (1965). Sap pressure in vascular plants. Sciences 148: 339- 346.
- Scholander, P. F.; Hammel, H.T.; Bradstreet, E. D.; Hemmingsen, E. A. (1964). Hydrostatic pressure and osmotic potential in leaves of mangroves and some other plants. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52: 119- 125.
- Segura, J. (2003). De Stephen Hales a la biología molecular: Reflexiones sobre la revolución biotecnológica y su impacto en la sociedad y en la universidad. Ed. Publicaciones de la Universidad de Valencia, 70 p.

- Seko, Y.; Kozai, T. (1996). Effect of CO₂ enrichment and sugar-free medium on survival and growth of *Tufgrass regenerants* grown *in vitro*. *Acta Horticulturae* 440: 600-605.
- Sutter, E. G. (1985). Morphological, physical and chemical characteristics of epicuticular wax on ornamental plants regenerated *in vitro*. *In vitro Cell Devel. Biol.* 27: 52-56.
- Tadeo, F. (2000). Fisiología de las plantas y el estrés. En: J. Azcón- Bieto y M. Talón Fundamentos de Fisiología Vegetal. Ed. Mcgraw- Hill. Interamericana. p. 481- 497.
- Tellez, E.; Pérez, A.; González, R.; Caballero, R.; Videaux, P. y Paña, M. (2000). Manejo de vitroplantas de ñame y malanga en fase de adaptación. Programa de resúmenes del XII Seminario Científico del INCA. 188 p.
- Teran, Z.; G. Grass.; R. Plana. (1996). Sustrato más eficiente con zeolita para la adaptación de vitroplantas de caña de azúcar. *Cultivos Tropicales* 17(3): 47-51.
- Thorpe, T. A. Y Biondi, S. (1982). Conifers. In: W. R. Sharp, D. A. Evans, P. V. Ammirato and Y. Yamada (eds.): Applications of plant tissue culture methods for crop improvement. MacMillan. New York. Vol. 2
- Thimijan, R.W. y Royal, D.H. (1982). Photometric, Radiometric, and Quantum Light Units of Measure: A Review of Procedures for Interconversion. *HortScience*. (18): 818 - 822.
- Torres, J y Mogollón, N. (2002). Efecto del Pbz sobre la brotación y el desarrollo *in vitro* de la epidermis foliar de *Cattleya mossiae parker ex hooker* previo a la aclimatización. *Bioagro* 14(1): 25-28.
- Torres, J.; Laskowski, L. y Sanabria, M E. (2006). Environmental effect during growth on anatomical characteristics of leaf epiderm in *Cattleya jenmanii* Rolfe. *Bioagro*. [online]. 18 (2): 93-99.

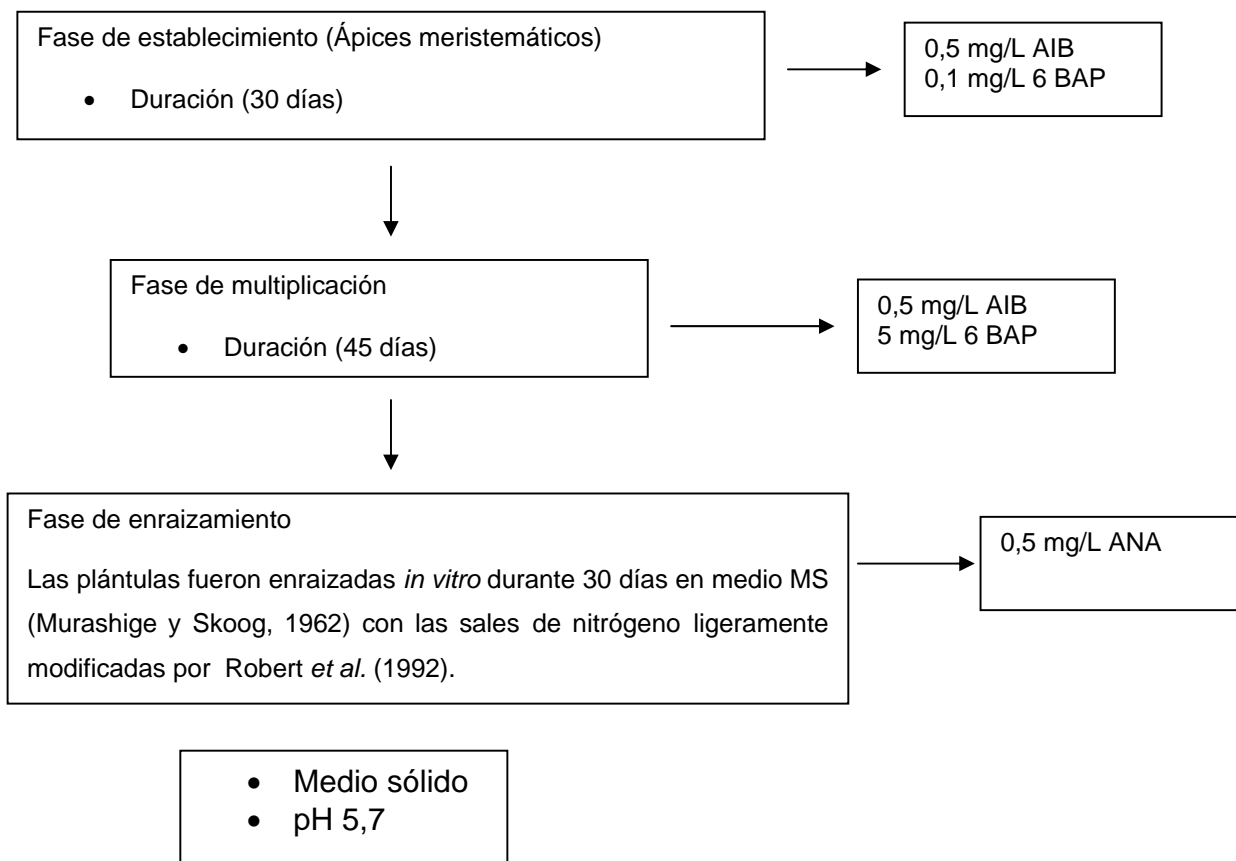
- Torres, K. C. (1989). Stage of micropropagation. In: Tissue culture techniques for horticultural crops. Van Nostrand Reinhold. New York. pp. 52- 69.
- Torres, W. (1985). Metodología del análisis del crecimiento en plantas aplicado al estudio del desarrollo en dos variedades de papa (*Solanum Tuberosum* L.) en diferentes fechas de plantación. Tesis en opción al grado de Candidato a Doctor en Ciencias Agrícolas. INCA. La Habana.
- Traore, A.; Maximova, S. N. y Guilittinan, M. J. (2003) Micropropagation of *Theobroma cacao* L. Using Somatic Embryo- Derived plants. Society for *in vitro* Biology, p. 1- 7.
- Urquiza, M.; Fernández, A y González, A. (1980). Estudio comparativo de cuatro métodos de determinación de carbono orgánico en suelos. Ciencia y técnica de la agricultura 3. (11): 29-40.
- Vanderschaeghe, A. M.; Debergh, P. C. (1987), Technical aspects of the control of the relative humidity in tissue culture containers. En: Ducate, G.; M. Jacob; A. Simeon (eds).
- Van Huylenbroeck, J. M. (1994). Influence of light stress during the acclimatization of *in vitro* plantlets. En: P.C. Struik. (eds.). Plant Production on the Threshold of a New Century. Kluwer Academic Publishers. pp. 451-453.
- Van Huylenbroeck, J. M.; Debergh, P. C. (1992). Acclimatization of micropropagated *Gerbera jamesonii* use of chlorophylla fluorescence. Med. Fac. Land-bouww. Univ. Gent., 57/ 4a: 1575- 1579.
- Van Huylenbroeck, J.; Debergh, P. (1996): Physiological Aspects in Acclimatization of Micropropagated Plantlets. Plant Tissue Culture and Biotechnological. 2 (3): 136-141.
- Van Huylenbroeck, J. M.; De Riek, J. (1995). Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* "Petite" plantlets. Plant Science 111: 19-25.

- Van Huylbroeck, J. M.; Huygen, H.; Debergh, P. C. (1995). Photoinhibition during acclimatization of *Spahtiphyllum* Petite plantlets. *In vitro* Cell Dev. Biol. Plant, 31: 160-164.
- Van Huylbroeck, J.; Piqueras, A.; Debergh, P. (1998): Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plans. *Plant Science* 134: 21-30.
- Viegas R, P H.; Liner P, A M.; Ambrosano, G M.; Batista D, M de F. (2005). Acclimatization of micropropagated *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) plants. *Sci. agric.* 62 (3).
- Vilchez, J.; Ramírez, E.; Villasmil, M.; Albany, N.; León de Sierralta, S.; M. Molina, M. (2007). Aclimatización de vitroplantas de zábila (*Aloe vera* (L.) Burm. f): efectos del sustrato. *Rev. Fav. Agron. (LUZ)*, 24 Supl. (1): 57-61.
- Vinent S, E.; Valdés T, C.; Grillo R, O. (1998). Análisis de las alternativas para la producción de henequén en Cuba. *Proyección 1998- 2007*. Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". 19 p.
- Walting, J. R.; Press, M. C.; Quick, P. (2000). Elevated CO₂ induces biochemical and Ultrastructural changes in laves of the C₄ Cereal Sorghum. *Plant Physiology*. 123: 1143- 1152.
- Weston , F. (2000). "Fundamentos de administración financiera". Ed. Décima.
- Whittle, J. (1987). Physical and Chemical properties of peat. *Proc. Inter. Plant. Soc.* 36: 284-287.
- Yanes P., E.; González O., J.; Rodríguez S., R. (2000). Ligth Management During Acclimatization of Pineapple (*Ananas Comosus* (L.) Merr.) cv. Cayena lisa "Serrana" Vitroplants. *Pineapples News*. 7: 3 – 5.

- Yue, D.; Gosselin, A.; Desjardins, Y. (1993). Effects of forced ventilation at different relative humidities on growth, photosynthesis and transpiration of geranium plantlets *in vitro*. *Can. J. Plant Sci.* 73: 249- 256.
- Zliv, M. (1995). *In vitro* acclimatization. En: Aitken- Christie, J.; T. Kozai; M. L. Smith (eds). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, pp 493 – 516.
- Ziv, M. (1991). Quality of micropropagated plants–vitrification. *In vitro Cell Dev. Biol.* 27: 64-69.
- Ziv, M.; Schwarts, A.; Fleminger, D. (1987) Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant Sci.* 52: 127-134.

Anexo 1.

Esquema de la fase *in vitro*, de acuerdo con el protocolo de micropropagación establecido por González (2001) para el cultivo del henequén.



Se utilizaron plántulas procedentes del 8^{vo} subcultivo

Anexo 2.

Tabla 1. Resultados del análisis químico de la pulpa de henequén descompuesta por 60 días (González, 2001).

Valores	pH	Hum.	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	M.O.	P	K	C _a	Mg
	H ₂ O	%		Kg/ha		%	p.p.m.	meq/100g		
Media (10 v)	8,25	38,7	789	280	1657	26,31	61	1,77	28,04	8,01
Valor Menor	8,10	29	554	160	1135	18,48	35	1,21	23,80	7,2
Valor Mayor	9,4	53	1047	366	1914	34,91	80	2,18	34,20	10,5

Se observa que en general el material mantiene características estables en su pH, con contenido de materia orgánica y buena riqueza de macro elementos. El análisis se realizó para 10 muestras.

Tabla 2. Análisis químico del material orgánico de pulpa de henequén descompuesta en base húmeda (% de humedad de campo 31.3).

% K	C/N	% Ca	% Mg	% P	% MO	pH	% N
0,03	10	1,49	0,26	0,07	22,4	8	1,30

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

Densidad del material: 0,48 g/cm³

Anexo 3.

Agrupamiento:	Ferralítico
Tipo:	Ferralítico Rojo
Subtipo:	Típico
Forma del terreno circundante:	Ondulado
Formación geológica:	Caliza del Neogeno
Agricultura tradicional:	Henequén, pasto natural
Pendiente máxima:	4,1- 7 %
Roca madre:	Caliza dura
Drenaje superficial e interno:	Bueno
Altitud:	85 m

Descripción:

Horizontes:

A _{1p} 0 - 20 cm :	Arcilla de color pardo rojizo (10 R 3/4) en húmedo, friable, ligeramente plástico, ligeramente adhesivo, estructura granular, no se observan superficies brillantes, poco agrietamiento, poroso, muchas raíces finas de penetración vertical, transición notable con el horizonte subyacente, límite plano efervesce al HCl al 10 %.
(B) 20 – 30 cm	Arcilla de color pardo rojizo (10 R 3/6) en húmedo, poco plástico, poco adhesivo, estructura poliédrica fina, friable, sin superficie brillante, no agrietado, poroso, algunas raíces, transición notable e irregular no efervesce al HCl al 10 %.
C de 30 a más	Roca caliza dura, parcialmente meteorizado, pardo rojizo claro.




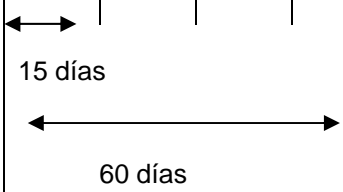
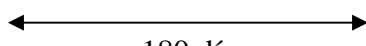
Cationes intercambiables (mmol/ 100g)


Horizonte Genético	Profundidad (cm)	pH		Y ₁	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺	Na ⁺	S	T	V %
		KCL	H ₂ O								
A _{1P}	0 - 20	6,0	6,7	1,85	13,56	1,86	0,4	0,26	16,08	21,3	75,49
(B)	20 - 30	6,2	6,8	1,37	14,02	1,82	0,38	0,20	16,42	20,33	80,76

Análisis agroquímico

Horizonte Genético	Profundidad (cm)	P ₂ O ₅ (Asimilable) Mg/100g	K ₂ O (Asimilable) Mg/100g	MO %
A _{1P}	0 - 20	13,66	21,87	2,92
(B)	20 - 30	8,81	11,53	2,22

Anexo 4. Esquema de montaje del experimento 3.6

Tratamientos	Tiempo de aclimatización en casa de cultivo (días)				Tiempo en días en previvero	Tiempo total del proceso en días
Salida de <i>in vitro</i>						
15 días						
30 días						210
45 días						225
60 días						240
	 <p>15 días</p> <p>60 días</p>				 <p>180 días</p>	

 Tiempo de aclimatización para cada tratamiento en casa de cultivo.

 Tiempo en previvero para cada tratamiento.

Anexo 5. Ficha de costo del proceso de aclimatización

Recursos empleados	Unidades a emplear	Costo Unitario	Moneda Nacional (MN)	Moneda Convertible (CUC)
Plántulas (90 % de supervivencia)	550 000 plantas	\$ 0,077	X	
		\$ 0,015		X
Total de bandejas de 247 alvéolos a emplear en un mismo lote, de acuerdo con la capacidad de la instalación.	282	\$ 0,87	X	
Sustrato.				
• Zeolita	t	\$ 12,08	X	
• Cantidad de sustrato por bandeja.	2,32 kg			
• Cantidad total a emplear	5 800 kg			
• Cantidad total de zeolita a emplear	3 213,2	\$ 38,81		
Energía.				
• Electricidad:	kW/h	\$ 0,11	X	
30 días	111			
45 días	149			
60 días	187			
• Combustible diesel	L	\$ 0,40	X	
	20 L	\$ 8,00	X	
• Agua	m ³	\$ 0,30	X	
30 días	513,02			
45 días	692,80			
60 días	872,52			
Fuerza de trabajo				
• Salario:				
Técnico	1	\$/h 1,41	X	
Chofer.	1	\$/h 1,17	X	

- El costo de la pulpa de henequén solamente se reflejó por concepto de consumo de combustible en la transportación.
- El costo unitario de las plántulas en el proceso *in vitro* lo establece González (2001).