

Efecto de la Sustitución de un Hidrolizado Enzimático de Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) como Medio de Cultivo para la Propagación *In vitro* de Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.)

Cristian Malavert¹ y Gerardo Gonzales²

Resumen. Los agaves son plantas tropicales de usos múltiples como la obtención de licores, el empleo artesanal de la fibra de sus hojas y el uso tradicional en la medicina. Sin embargo, es muy complejo establecer plantaciones grandes por métodos convencionales. El objetivo fue evaluar la respuesta morfogénica de brotes de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) cultivados en un medio donde se sustituyó una parte de la fuente de nitrógeno por una solución de hidrolizado de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), como una alternativa para abaratar los costos de producción de vitroplantas. En una prueba inicial se utilizó el hidrolizado de levadura puro y a los porcentajes propuestos (12.5, 25.0 y 37.5%) con sacarosa (3%) y los reguladores de crecimiento (2,4-D 0.025 mg/L + BAP 10.0 mg/L) hubo 100% de mortalidad. Lo que más influyó negativamente durante la etapa de multiplicación en los explantes fue la fenolización. El hidrolizado activó la fenoloxidasa, ya que este producto posee compuestos fenólicos que son tóxicos, pues retrasan el crecimiento y desarrollo fisiológico de los explantes y disminuyen la supervivencia. Se concluye que la sustitución de una parte de la fuente de nitrógeno por una solución de hidrolizado de levaduras disminuye la eficiencia biológica en la propagación *in vitro* del henequén, motivado por una elevada mortalidad en los explantes y también se estimula la contaminación sistémica en presencia de los medios que tienen hidrolizado de levaduras.

Palabras clave: Agaváceas, biotecnología vegetal, cultivo de tejidos vegetales, explantes.

Effect of Substitution with a Yeast Enzymatic Hydrolysate (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Culture Medium for *in Vitro* Propagation of Henequen (*Agave fourcroydes* Lem.)

Abstract. Agaves are tropical plants with multiple uses such as making liquors, fiber from their leaves for handicrafts, and traditional use in medicine. However, it is very difficult to establish large plantations by conventional methods. Our objective was to evaluate the morphogenic response of henequen shoots (*Agave fourcroydes* Lem.) cultivated in a medium in which a part of the nitrogen source was replaced by a solution of hydrolyzed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as an alternative for reducing costs of *in vitro* plant production. An initial test using a pure concentration of hydrolyzed yeast and proposed percentages of 12.5, 25.0, and 37.5% with sucrose (3%), and also growth regulators (2.4-D 0.025 mg / L plus BAP 10.0 mg / L), resulted in 100% mortality. The most influential negative factor during the multiplication stage in the explants was phenolization. Hydrolyzed yeast activated phenol oxidase, yet this product has phenolic compounds that are toxic and delay the growth and physiological development of the explants and consequently decrease survival. We conclude that the substitution of a part of the nitrogen source by hydrolyzed yeast results in a decrease in the biological efficiency of *in vitro* propagation of henequen. This is due to high mortality of explants and stimulated systemic contamination in the presence of a medium containing a hydrolyzed yeast solution.

Keywords: Agavaceae, plant biotechnology, plant tissue culture, explants

Introducción

La familia de las Agaváceas (Género agave) es importante económicamente como fuente de fibra dura, carbohidratos, alcoholes y sapogeninas

esteroidales (Dewey, 1941; González *et al.*, 2004). Varios cultivos se usan ampliamente comercialmente, mientras que otros se cosechan de la naturaleza.

El cultivo del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.)

¹ Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO), Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas, Camilo Cienfuegos, Matanzas, Cuba. Correo electrónico malavert@agro.uba.ar

² Centro de Estudios Biotecnológicos (CEBIO), Facultad de Agronomía, Universidad de Matanzas, Camilo Cienfuegos, Matanzas, Cuba. Correo electrónico gerardo.gonzalez@umcc.cu

es una de las especies de mucha importancia económica principalmente para la industria textil y por sus derivados (Robert *et al.*, 2006). El henequén posee una característica que distingue a casi todos los agaves, esta es que puede reproducirse de tres maneras. i) La primera y más usada es la de rizomas, los cuales son raíces modificadas del agave y que, a diferencia de las que dan soporte y alimentación, dan origen a una nueva planta; este medio de reproducción es asexual y por lo tanto la nueva planta será idéntica a la que le dio origen (Infante *et al.*, 2003; González *et al.*, 2004; Robert *et al.*, 2006). ii) La otra forma de reproducción ocurre a finales del ciclo biológico de la planta, se manifiesta con la floración, a partir de la cual se originan unos bulbillos capaces de generar nuevas plántulas idénticas a la planta que las origina (reproducción asexual) (Madrigal *et al.*, 1990; González *et al.*, 2002; Medina *et al.*, 2011). iii) La tercera opción es a partir de las flores que han sido fecundadas y que dan lugar a la producción de semilla (tarda alrededor de 20 años, única floración), en proporción es una cantidad extremadamente baja la cantidad de cápsulas de semillas que se produce en relación a las flores que se generan, la cápsula contiene una cantidad variable de semillas y la mayor proporción de ellas son vanas y las viables suelen germinar sin problema (Robert *et al.*, 1992; Medina *et al.*, 2011). Por lo tanto, la reproducción asexual es la vía por la cual el henequén puede maximizar las producciones agrícolas, logrando en menor tiempo establecer plantaciones homogéneas y de alta calidad (Colunga y May, 1993; González *et al.*, 2003).

Las técnicas de producción utilizadas por los agricultores siguen siendo tradicionales, lo cual restringe la productividad del cultivo (Abreu *et al.*, 2007; Colunga, 1998). Es por ello que el establecimiento y la renovación de las plantaciones son dos aspectos deficientes en la producción, ya que la semilla utilizada procede de técnicas poco eficientes, desde el punto de vista productivo y sanitario (González *et al.*, 2004). Como una herramienta alternativa existe la reproducción *in-vitro*, la cual consiste en un conjunto de técnicas y métodos de cultivos de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente de forma rápida, eficiente y en grandes cantidades (Castillo, 2004; Colunga *et al.*, 1999). Sin embargo, la micropropagación presenta su mayor inconveniente en los costos un tanto elevados para los pequeños productores. Con sólo el empleo de la propagación tradicional se hace casi imposible el establecimiento de plantaciones de alta calidad en breve, lo que dificulta lograr el imperativo de la

recuperación henequenera (Debergh, 1983). De ahí la relevancia de lograr tecnologías que puedan aplicarse a gran escala, con germoplasma seleccionado y que resulten económicamente atractivas, para devolverle a esta fibra vegetal su valor económico (González *et al.*, 2002; González *et al.*, 2004). Por esta razón surge la necesidad de experimentar con la utilización de medios de cultivo naturales como, agua de coco, jugo de tomate, extractos de levaduras, maltas o maíz, como alternativa para disminuir los costos de la producción de plantas obtenidas *in vitro*. Investigar nuevas técnicas de propagación *in vitro* permitirá de alguna manera hacer más eficiente este proceso.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta morfogénica de brotes de henequén cultivados en un medio basal de MS donde se sustituye una parte de la fuente de nitrógeno por una solución de hidrolizado de levaduras ricas en aminoácidos libres, minerales y vitaminas. Ya que es un complejo de nutrientes, es una alternativa que permite abaratar los costos de producción de *in vitro*-plantas, sin disminuir la calidad de las mismas.

Materiales y Métodos

Selección del material vegetal. Se utilizaron plantas de henequén de la variedad Sac Ki o henequén blanco (González *et al.*, 2004) crecidas en condiciones de plantación comercial de las Empresas Henequeneras Eladio Hernández (Granja La Conchita) y Antonio Berdayes (Granja Limonar), Provincia de Matanzas, Cuba. Se seleccionaron plantas élites con óptimas características tales como: elevado vigor de la planta, longitud de las hojas que varió entre 120 y 130 cm, número de hijos basales entre 5 y 7, ancho de la zona media y basal de la hoja.

Preparación del material vegetal. Se utilizaron vástagos de entre 10 y 15 cm de alto crecidos alrededor de la planta madre seleccionada. A los explantes de las plantas seleccionadas se les eliminaron los residuos gruesos de suciedad colocándolos bajo agua corriente de 30 minutos a 1 hora, luego se lavaron con detergente y se introdujeron en etanol al 70 % (v/v) por 3 minutos y se flamearon.

Para la desinfección superficial se siguió el siguiente procedimiento:

Doble desinfección con hipoclorito de sodio: (a) Los explantes se colocaron en una disolución de hipoclorito de sodio al 5% durante 20 minutos, luego se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y

se eliminaron las partes dañadas por el cloro. (b) Las muestras fueron desinfectadas por segunda vez durante 10 minutos en una disolución de hipoclorito de sodio al 5%. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y los fragmentos dañados por el cloro fueron eliminados.

Luego de la desinfección de los vástagos, en la cámara de flujo laminar se extrajeron láminas foliares de 1 cm² de los vástagos y fueron sembrados en un medio MS apolar como se explica a continuación.

Condiciones para el acondicionamiento del material vegetal. Los explantes desinfectados fueron sembrados en el medio para el establecimiento (MS). Se utilizó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con las modificaciones propuestas por Robert *et al.* (1992), suplementado con sacarosa (3% p/v) y mio-inositol (100 mg·l⁻¹). Se emplearon frascos de vidrio de 250 ml con 25 ml de medio de cultivo. La esterilización de los medios de cultivo fue en autoclave a una temperatura de 121 °C y presión de 1.2 kg·cm⁻² durante 20 min. La solidificación se hizo siempre con Agar Técnico #3 (BIOCEN). El pH se ajustó a 5.7 con HCl (0.1 N) antes de la esterilización. Los cultivos se incubaron en cámaras de luz solar con una iluminación aproximada de 3000 lux (37.5 μmol·m⁻²·s⁻¹) y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad. La temperatura en las cámaras osciló entre los 25 y 28°C.

Tratamientos. Para evaluar la respuesta morfogénica de los explantes se utilizaron tres medios de cultivo basal MS con sustitución de las fuentes de sales de nitrógeno (N) (MS 100%, control, según Robert *et al.* (1992), MS 70% y MS 50%). A los medios MS 70% y MS 50%, se les reemplazó la fuente de N por las concentraciones del hidrolizado de la levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (0, 12.5, 25.0 y 37.5%). Los tratamientos fueron nueve, con 10 réplicas en cada uno, para un total de 90 unidades experimentales.

Evaluación del efecto del medio de cultivo sobre la supervivencia de los explantes, la contaminación y la tasa de multiplicación. Para el porcentaje de mortalidad se contaron los individuos muertos (explantes necrosados sin respuesta), con lo cual se obtuvo el cociente entre éste y el número de individuos vivos, para su posterior multiplicación por 100. Se identificaron las posibles causas de muerte por métodos visuales, para determinar y analizar los posibles problemas patológico o fisiológico (oxidación o hiperhidricidad). También se contó el número de brotes, valor que se dividió entre el número de frascos y se determinó el índice de multiplicación. Se

sembraron 10 explantes por tratamiento y se evaluaron a los 30 días.

Determinación del contenido de proteínas totales. Para cuantificar como se afecta el índice de multiplicación de los explantes, se determinó el contenido de proteínas totales. La concentración de proteínas fue estimada por el método de Lowry *et al.*, (1951) a partir del sobrenadante tomado de las muestras homogenizadas. Los carbohidratos totales fueron determinados en el sobrenadante de las muestras homogenizadas por el método del fenol-sulfúrico, usando glucosa como estándar (Dubois *et al.*, 1956).

Determinación de azúcares reductores. Para cuantificar cómo la fuente de carbono en el cultivo *in vitro* se ve afectada al reducir la fuente de N se determinaron los azúcares reductores. Los azúcares reductores pueden reducir al ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Para determinar el contenido de los azúcares reductores se añadieron 4.475 ml de agua destilada, 25 ml de muestra y 500 μM de reactivo DNS. Se mantuvo la mezcla en baño de agua hirviendo durante 5 minutos y luego se midió la absorbancia a 540 nm, interpolando el valor obtenido con los valores calculados para soluciones de sacarido de concentración conocida.

Análisis estadístico. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Statgraphics Versión 5.0 (Polhemus, 1980). Para cada población de datos se analizó que cumplieran la distribución normal (Kolmogorov –Smirnov) y que cumplieran con la prueba de homogeneidad de la varianza (Bartlett). Los resultados se procesaron estadísticamente con un análisis de varianza de clasificación simple, con un diseño completamente aleatorizado. Los datos en porcentajes se transformaron según $X = 2 \arcsin(X/100)$ 0.5. Para detectar la diferencia entre las medias se realizó un ANOVA y la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan para el 5% de significación.

Resultados y Discusión

Evaluación del efecto del medio de cultivo sobre el porcentaje de supervivencia de los explantes y la tasa de multiplicación. En una prueba inicial donde se utilizó el hidrolizado de levadura en concentraciones de 12.5, 25.0 y 37.5%, con sacarosa (3%) y los reguladores del crecimiento (2,4-D 0.025 mg/L + BAP 10.0 mg/L) en MS al 100, 70 y 50%, hubo 100% de mortalidad en los explantes (Tabla 1). Estos resultados demuestran que el hidrolizado de levaduras

(*Saccharomyces cerevisiae*) utilizado como sustituto de la fuente de N no es apto para usar en la micropropagación *in vitro* de explantes de henequén, a pesar de ser ricas en aminoácidos libres, minerales, vitaminas y además de su uso satisfactorio en medios

para el crecimiento de microorganismos (Pérez *et al.*, 2007). Sin embargo, en los tratamientos a los cuales no se les aplicó el hidrolizado de levaduras presentaron los mejores resultados ($P < 0.001$), aun cuando se les redujo la fuente de N (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del hidrolizado de levadura sobre el porcentaje de supervivencia y la tasa de multiplicación en explantes de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.).

Tratamientos		Supervivencia (%)	Contaminación (%)	Índice de multiplicación
Murashige y Skoog (Sales portadoras de N)	Hidrolizado de levaduras (%)			
Murashige y Skoog 100%	0.0	100 a [§]	5 b	4.0 a
Murashige y Skoog 70%	0.0	100 a	5 b	3.5 a
	12.5	5 b	90 a	0.0 c
	25.0	0 c	100 a	0.0 c
	37.5	0 c	100 a	0.0 c
Murashige y Skoog 50%	0.0	100 a	8 b	2.3 c
	12.5	10 b	100 a	0.0 c
	25.0	10 b	100 a	0.0 c
	37.5	0 c	100 a	0.0 c
Error estándar		2.4	1.5	0.08

[§] Valores en las columnas con letras diferentes difieren significativamente ($P > 0.05$).

El hidrolizado estimuló la fenolización (necrosis), la cual se favorece por la presencia de fenoles y polifenoxidasas, comunes en el metabolismo de oxidación (Rasai *et al.*, 1995), que reducen el enraizamiento y disminuyen la viabilidad de los explantes y su respuesta morfogénica (Tabla 1). La fenolización o ennegrecimiento ocurre por las enzimas polifenol oxidasas (PPA) y tirosinasas que se liberan o sintetizan cuando los tejidos sufren heridas (Amiot *et al.*, 1996; Bray *et al.*, 2000). Éstas actúan sobre los polifenoles y la tirosina, oxidándolos a quinonas que son fitotóxicas, sustancias que pueden polimerizarse y afectar a las proteínas, y en consecuencia, inhiben el crecimiento y el desarrollo de los explantes (Dalal *et al.*, 1992; George, 1996).

Los resultados sugieren que el empleo del hidrolizado favorece el crecimiento y desarrollo de los contaminantes sistémicos presentes en el tejido del henequén, lo cual resulta interesante como un método de control temprano de una contaminación endógena sistémica pre-existente, que a lo mejor no se expresaría en varios subcultivos ni en todo el proceso si no se hubiese utilizado el hidrolizado.

Los explantes sin el hidrolizado mostraron que el índice de multiplicación no presentó diferencia

significativa entre los tratamientos con el 100% y el 70% de las sales portadoras de N en el medio de cultivo (Tabla 1 y Figura 1). Sin embargo, se observó una diferencia en el índice de multiplicación para el 50% de sales portadoras de N. Estos resultados fueron evidenciados por el número de brotes y la altura en cada condición (Figura 1).



Figura 1. Respuesta morfogénica de explantes de henequén expuestos a medios basales MS de 100, 75 y 50% de sales portadoras de N. Estos tratamientos se corresponden a MS 100% + 0, MS 70% + 0 y MS 50% + 0 (0, es sin presencia del hidrolizado de levaduras).

Los tratamientos con 100 y 70% de sales portadoras de N mostraron una proliferación axilar donde se destaca el medio con el 100% del nitrógeno y luego una proliferación intermedia a 70%, mientras que la proliferación fue baja para el 50%. A pesar de la disminución de este macroelemento esencial para garantizar el crecimiento y desarrollo de los vegetales, en los tratamientos donde se redujo el nitrógeno (MS 70% y MS 50%) se logró, no obstante, alcanzar un buen número de brotes finales y un buen establecimiento de los explantes.

Según la curva de regresión bilineal, donde la variable dependiente fue el índice de multiplicación y la variable independiente las concentraciones de nitrógeno (100, 70 y 50%), los resultados indican la existencia de un óptimo de 82% de nitrógeno ($R^2 = 0.91$) por encima del cual no se afecta el índice de multiplicación; sin embargo, por debajo de este valor la tasa con la cual se afecta es dependiente de la concentración de N, hasta un valor mínimo o umbral de 44% de N (Figura 2).

Estos resultados sugieren que por encima del 82% de N, la tasa de multiplicación no se ve afectada, ya que es la fase más importante y determinante en todo programa de propagación *in vitro*; se puede concluir entonces que hace falta establecer un adecuado balance del medio de cultivo que permita una aceptable brotación y un mantenimiento de la estabilidad genética del material obtenido *in vitro*.

Determinación del contenido de proteínas totales.

Los tratamientos sin el hidrolizado de levadura superaron estadísticamente en cantidad de proteínas totales a los tratamientos donde se utilizó el hidrolizado (Figura 3). El control (100% de N) no se diferenció del tratamiento donde se redujo el contenido de nitrógeno al 70%, pero se diferenció al reducir el contenido de nitrógeno al 50%. La disminución del contenido de nitrógeno de 50% causó una disminución del contenido de proteínas totales y pudiera estar determinando la causa de que se produjera un índice de multiplicación inferior al control (100% N).

Determinación del contenido de azúcares reductores.

El contenido de azúcares reductores en el mesófilo de la hoja fue influenciado por el porcentaje de nitrógeno y del hidrolizado de levaduras en el medio de cultivo (Figura 4). El valor más elevado fue donde se utilizó el 100% de nitrógeno. En orden decreciente se ubicaron los tratamientos con 70%, 50%, y por último los tratamientos donde se empleó el hidrolizado.

Esto sugiere que el nitrógeno es importante para mantener un suministro adecuado de la fuente de carbono en el cultivo *in vitro*. Por ejemplo, la deficiencia de nitrógeno o fósforo en tabaco induce cambios en la actividad de enzimas que afectan la acumulación de carbohidratos (Knox y Clarke, 2005). La disminución del contenido de nitrógeno afecta la adsorción de hierro y la disminución de hierro disminuye el contenido de azúcares reductores (Chatterjee y Chatterjee, 2005).

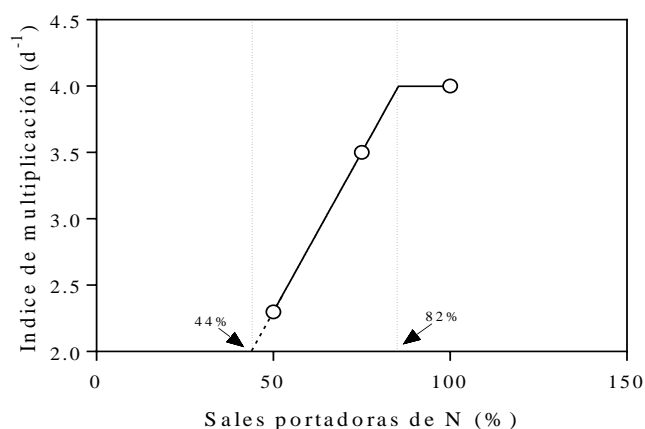


Figura 2. Índice de multiplicación de explantes de henequén en función de los porcentajes de sales portadoras de N. Las líneas punteadas verticales indican los umbrales mínimo y máximo de N de respuesta.

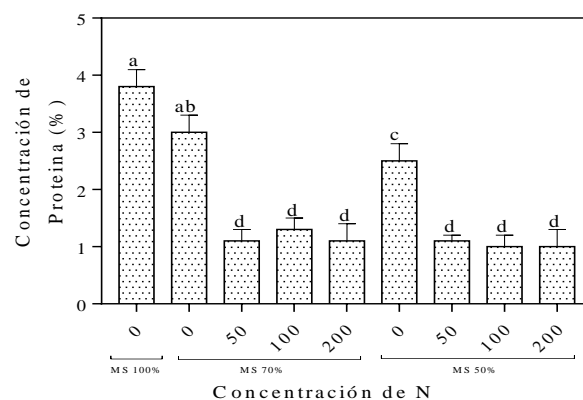


Figura 3. Comportamiento del contenido de proteínas totales (%) en función de los medios de cultivo con sustitución de parte de las sales portadoras de nitrógeno por el hidrolizado de levaduras. Barras con

letras distintas difieren estadísticamente ($P>0.05$). Las barras indican el error estándar (ES).

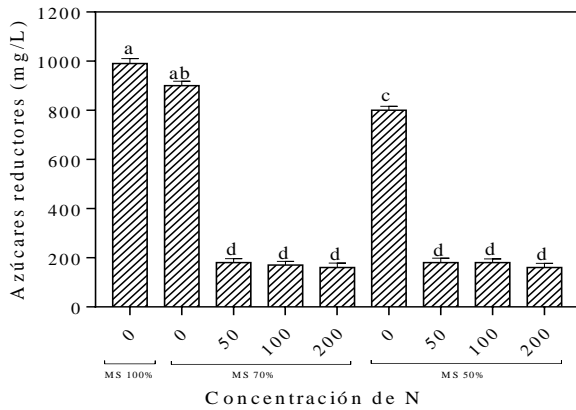


Figura 4. Determinación de la concentración de azúcares reductores en función de las concentraciones de nitrógeno en el cultivo del henequén. Barras con letras distintas difieren estadísticamente ($p>0.05$). Las barras indican el error estándar (ES). Proteínas = 1.483 y Azúcares Reductores = 2.653.

Conclusiones

La sustitución de una parte de la fuente de nitrógeno por una solución de hidrolizado de levaduras produce una disminución de la eficiencia biológica en la propagación *in vitro* del cultivo del henequén, provocada por el hidrolizado, que a su vez, induce la necrotización estimulada por la fenolización.

En presencia de los medios que contienen una solución de hidrolizado de levaduras es estimulada la expresión de cualquier contaminación endógena sistémica pre-existente en los tejidos.

Existe un valor umbral de 82% de N, por encima del cual el índice de multiplicación de explantes de henequen no se afecta.

La utilización de una solución de hidrolizado de levaduras como sustituto de nitrógeno mineral en los medios de cultivo provoca una reducción del contenido de proteínas totales y de los azúcares reductores.

Bibliografía

Abreu E., González G., Ortiz R., Rodríguez P., Domech R. y Garriga M. 2007. Evaluación de vitroplantas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem) durante la fase de aclimatización. Cultivos Tropicales, 28 (1): 5-11.

Amiot M., Forget F. y Goupy P. 1996. Polyphenol, oxidation and colour: progress in the chemistry of enzymatic and non-enzymatic derived products. Herba Polonica, 42: 237-247.

Bray E., Bailey-Serres J. y Weretilnyk E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan, B; Gruissem, W; Jones, R. eds. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. p. 1158-1203.

Castillo A. 2004. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. INIA, Uruguay.

Chatterjee J. y Chatterjee C. 2005. Deterioration of fruit quality of tomato by excess cobalt and its amelioration. Communication in Soil Science and Plant Analysis, 36 (13-14), 1931-1945.

Colunga-García M.P. y May-Pat F. 1993. Agave Studies in Yucatán, México. I. Past and Present Germplasm Diversity and Uses. Economic Botany, 47 (3):312-327.

Colunga-García M.P., Coello-Coello J., Eguiarte L. y Piñero D. 1999. Izomatic variation and phylogenetic relations between henequén *Agave fourcroydes* Lem. and its wild ancestor *A. angustifolia* Haw. American Journal of Botany, 86 (1): 115-123.

Colunga-García M.P. 1998. Origen, variación y tendencias evolutivas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem. Boletín de la Sociedad Botánica de México (Sección Perspectivas), 62: 109-128

Dalal M.A., Sharma B.B. y Srinivasa M.R. 1992. Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning *in vitro*. Cultures of grapevine. Science Horticulturae, 51: 35-41

Debergh P.C. 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. Physiologia Plantarum, 59: 270-276.

Dewey H. 1941. Principales fibras Textiles. México: Unión Panamericana, p.1-14.

Dubois M.K., Gilles A., Hamilton J.K., Rebers P.A. y Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical. Chemistry, 28: 350-356.

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

González G., Alemán S., Barredo F., Keb M., Ortiz R., Abreu E. y Robert M.L. 2004. Una alternativa de la recuperación henequenera de Cuba, mediante el uso de técnicas biotecnológicas y moleculares. Biotecnología Aplicada, 21: 44-49.

González G., Alemán S. e Infante D. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population. Plant Science, 165: 595-601.

González G., Alemán S., Trujillo R., Domech R., Abreu E. y Pérez Y. 2002. Influencia del 6 Benciladenina sobre el comportamiento *in vitro* de plantas de henequén obtenidas a partir de embriones. Biotecnología Vegetal, 2(4): 235-238.

- Infante D., González G., Peraza-Echeverría L. y Keb-Llanes M. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science*, 164:223-230.
- Knox K.P. y Clarke. 2005. Nutrient availability induces contrasting allocation and starch formation in resprouting and obligate seeding shrubs. *Functional Ecology*, 4(19):670- 690.
- Lowry O., Rosebrough N.H., Farr A.L. y Randall R.J. 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 225-272.
- Madrigal L.R., Pineda E.F. y Rodríguez de la O. J.L. 1990. *Agave*. Handbook of Plant Cell Culture. Philip V. Ammirato, David A. Evans. William R. Sharp and Yashpal P.S. Bajaj. Vol. 5: Ornamental Species. MacGraw-Hill Publishing Co., New York. 206-227.
- Medina M.A., Contreras-Esquivel J.C. y De la Garza Toledo H. 2011. Enzymatic Bioconversion of *Agave* leaves fiber hydrolysis using Plackett-Burman design. *AJABS*, 6 (4): 480-485.
- Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologica. Plantarum*, 15: 473-497.
- Pérez M., Piad R., Milián G., das Gracas F.M., Ferreira A., de Mancilha I.M., Laurencio M. y Batista de Almeida J. 2007. Preparation of a crude enzymatic from *Bacillus licheniformes* E-44 and its evaluation in the hydrolysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 452-455.
- Rasai S., George A.P. y Kantharajah A.S. 1995. Tissue culture of *Annona* spp. (*Cherimoya*, *atemoya*, sugar apple y soursop): A review. *Science Horticulturae*, 62: 1-14.
- Robert M.L., Herrera J.L., Chan J.L. y Contreras F. 1992. Micropropagation of *Agave* spp. In: Y.P.S. Bajaj, (ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 19: 306-329.
- Robert M.L., Herrera-Herrera J.L., Castillo E., Ojeda G. y Herrera-Alamillo M.A. 2006. An Efficient Method for the Micropropagation of *Agave* Species. En: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota F (eds) *Methods in Molecular Biology*, pp. 165-178. Humana Press, New Jersey; 10.1385/1-59259-959-1:165.

Recibido para publicación el 3 de mayo del 2017.

Aceptado para publicación el 1 de septiembre del 2017.

Publicado el 12 de febrero del 2018.