

Caracterización bioquímica e histológica de plantas aclimatizadas *in vitro* de *Agave fourcroydes* Lem.

Yunel Pérez Hernández, Maryla Sosa del Castillo, Leticia Fuentes Alfonso, Yasmery Rubio Fontanill, Aymara L Valdivia Ávila, Jovana Pérez Ramos

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Matanzas. Autopista a Varadero km 3/2. Matanzas. Matanzas. Cuba. CP 44740. e-mail: yunel.perez@umcc.cu

RESUMEN

El henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) constituye un cultivo representativo de la provincia de Matanzas, Cuba, el cual ha sido explotado extensamente por la calidad de sus fibras. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar desde el punto de vista bioquímico e histológico plantas de henequén cv. 'Sac Ki' aclimatizadas *in vitro*. Los indicadores bioquímicos analizados fueron concentración de fenoles solubles, carbohidratos solubles totales, azúcares reductores, proteínas solubles y clorofilas totales, así como los contenidos relativos de flavonoides, terpenos y antocianinas. Además, se realizó un análisis histológico de la epidermis y los resultados fueron comparados con plantas de un mes en medio de cultivo de enraizamiento. Las plantas aclimatizadas *in vitro* fueron transferidas posteriormente a condiciones *ex vitro*. Los contenidos de carbohidratos solubles totales, azúcares reductores y clorofilas disminuyeron, mientras que los niveles de fenoles solubles, proteínas y metabolitos secundarios fueron superiores en relación con las plantas *in vitro* enraizadas durante 30 días. La epidermis de las plantas aclimatizadas *in vitro* mostró un mayor desarrollo del aparato estomático que pudo incidir positivamente en la aclimatización *ex vitro*, donde se obtuvo un porcentaje de supervivencia del 87% y una reducción del tiempo de aclimatización.

Palabras clave: azúcares reductores, clorofila, fenoles, henequén

Biochemical and histological characterization of *Agave fourcroydes* Lem. plants *in vitro* acclimatized

ABSTRACT

Henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) is a representative crop of the province of Matanzas, Cuba, which has been exploited extensively for the quality of its fibers. The present work aimed to characterize from the biochemical and histological point of view henequen plants cv. 'Sac Ki' *in vitro* acclimatized. The biochemical indicators analyzed were concentration of soluble phenols, total soluble carbohydrates, reducing sugars, soluble proteins and total chlorophylls, as well as the relative contents of flavonoids, terpenes and anthocyanins. In addition, a histological analysis of the epidermis was performed and the results were compared with plants of one month in rooting culture medium. *In vitro* acclimatized plants were subsequently transferred to the *ex vitro* conditions. The contents of total soluble carbohydrates, reducing sugars and chlorophylls decreased, whereas the levels of soluble phenols, proteins and secondary metabolites were higher in relation to *in vitro* plants rooted for 30 days. The epidermis of the *in vitro* acclimatized plants showed a greater development of the stomatal apparatus that could positively affect the *ex vitro* acclimatization, where a survival rate of 87% and a reduction of the acclimatization time were obtained.

Keywords: chlorophyll, henequen, phenol, reducing sugar

INTRODUCCIÓN

El henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) es una especie que ha sido cultivada en Cuba desde principios del siglo XIX para la obtención de fibras, de uso en la elaboración de sogas, cordeles, cestos, alfombras, bolsas y prendas de vestir, entre otros productos (González *et al.*, 2004). Al igual que otros agaves, también ha sido utilizada en la fabricación de bebidas

alcohólicas y posee potencialidades en la industria biofarmacéutica, debido a los diferentes metabolitos que se encuentran en las hojas y otras partes de la planta (García-Curbelo *et al.*, 2015).

Como una vía para recuperar las plantaciones henequeneras de la provincia de Matanzas, en el Centro de Estudios Biotecnológicos de la Universidad de Matanzas se obtuvo una

metodología para la micropropagación de *Agave fourcroydes* Lem. (González, 2001; Abreu, 2009). La aclimatización de plantas constituye una etapa esencial al final de este proceso, ya que las condiciones *in vitro* inducen cambios anatómicos y fisiológicos notables en las plantas que provocan una elevada tasa de transpiración (Pérez-Santiago *et al.*, 2014). El control de factores como el riego y la iluminación tienen una función esencial para la adaptación de las plántulas al ambiente *ex vitro* y garantizar el tránsito hacia un estado autotrófico (Abreu, 2009).

Varios autores han destacado la importancia de realizar pretratamientos de aclimatización *in vitro* para incrementar la calidad fisiológica de las plantas previo a su transferencia a condiciones *ex vitro* (Ziv, 1995; Kadlecěk *et al.*, 2001; Alvarez *et al.*, 2012, Posada *et al.*, 2016).

Existen diferentes estrategias desde las fases *in vitro* para aumentar el porcentaje de supervivencia y calidad de las plántulas durante la aclimatización *ex vitro*. Algunas han consistido en suministrar una ventilación forzada a los frascos para disminuir la tasa transpiratoria en la fase de aclimatización (Aguilar *et al.*, 2000), reducir el potencial hídrico del medio de cultivo mediante el uso de sustancias osmóticamente activas como el polietilenglicol (Mahdia y Abd-Alla, 2010), incremento de la iluminación y ventilación (Álvarez *et al.*, 2012), entre otras.

Estos tratamientos favorecen la producción de ceras epicuticulares y con ello la preadaptación de las plantas obtenidas *in vitro*. Sin embargo, la disminución del potencial hídrico puede inducir cambios bioquímicos significativos en las plantas como el estrés oxidativo, en el cual las especies reactivas del oxígeno (EROs) puede provocar cambios estructurales y funcionales a macromoléculas importantes como proteínas, ácido desoxirribonucleico, lípidos y a estructuras membranosas donde ocurren numerosas reacciones metabólicas como la fotosíntesis y la respiración (Xu *et al.*, 2011; Heidari *et al.*, 2011; Sabra *et al.*, 2012).

Las plantas pueden responder frente a condiciones de estrés hídrico con diversos mecanismos. La eliminación de las EROs constituye una forma de atenuar el impacto de estos radicales reactivos sobre los componentes

celulares. El sistema antioxidante de las plantas está integrado tanto por compuestos enzimáticos como de naturaleza no proteica. Entre las enzimas antioxidantes se encuentran superóxido dismutasa, catalasas y peroxidasas (Haghighi *et al.*, 2014); mientras que en la vía no enzimática participan diferentes compuestos polifenólicos (flavononas, antocianinas), carotenoides (á-tocoferol, β -caroteno), ácido ascórbico, glutatión reducido, entre otros (Mervat y Dawood, 2014).

El alargamiento de la fase de enraizamiento sin reemplazo del medio de cultivo para pudiera constituirse en una estrategia para aclimatizar *in vitro* plantas de henequén. Ello podría contribuir a mejorar la calidad fisiológica de las plantas previo a su transferencia a la fase de aclimatización *ex vitro*, que garantice una supervivencia alta con menores exigencias de humedad e iluminación. Sin embargo, la disminución paulatina del potencial hídrico en el medio de cultivo puede conllevar a cambios bioquímicos y fisiológicos importantes. Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar desde el punto de vista bioquímico e histológico plantas de henequén aclimatizadas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron dos grupos de plantas *in vitro* de *A. fourcroydes* cultivar 'Sac Ki' propagadas según lo establecido por González (2001). Un grupo permaneció en un medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) para enraizamiento un mes y el otro grupo durante cinco meses para su aclimatización *in vitro*. Las plantas *in vitro* se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperíodo de 16 h de luz ($35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Para el análisis de los indicadores bioquímicos se utilizaron cinco plantas de cada grupo (tratamiento) con tres réplicas por cada uno y se determinó el contenido de clorofilas, carbohidratos solubles totales, azúcares reductores, fenoles solubles, flavonoides, terpenoides y antocianinas.

Contenido de clorofilas a, b y totales

Las hojas de las plantas *in vitro* (0.5 g) fueron trituradas en un mortero de porcelana con 5 ml de solución acuosa de etanol (BDH) al 96%

como solvente para la extracción de los pigmentos. Se emplearon las ecuaciones propuestas por Wintermans y de Mots (1965) para el cálculo de la concentración de clorofilas.

$$Ca \text{ (mg ml}^{-1}\text{)} = 13.95 (A_{665}) - 6.68 (A_{644})$$

$$Cb \text{ (mg ml}^{-1}\text{)} = 24.96 (A_{644}) - 7.32 (A_{665})$$

Ca = concentración de clorofila a

Cb = concentración de clorofila b

$$\text{Clorofila total: } Ca+b \text{ (mg ml}^{-1}\text{)} = (20.2 A_{649}) + (8.02 A_{665}).$$

Contenido de carbohidratos solubles totales

El contenido de carbohidratos solubles (mg ml⁻¹) totales se determinó en 0.5 g de hojas de plantas *in vitro* homogenizadas en 3 ml solución tampón de fosfato de sodio 20 mmol l⁻¹, pH=7.0. Se aplicó el método del fenol-ácido sulfúrico con D-glucosa (Sigma) como azúcar patrón (Dubois *et al.*, 1956). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 490 nm.

Contenido de azúcares reductores

El contenido de azúcares (mg ml⁻¹) se determinó por el método del ácido dinitrosalísílico con D-glucosa (Sigma) como azúcar patrón, en 0.5 g de hojas de plantas *in vitro* homogenizadas en 3 ml solución tampón de fosfato de sodio 20 mmol l⁻¹, pH=7.0 (Miller, 1959). La absorbancia se midió a una longitud de onda de 456 nm.

Contenido de proteínas solubles totales

El contenido de proteínas solubles totales (mg ml⁻¹) se determinó en 0.5 g de hojas de *in vitro* homogenizadas en 3 ml solución tampón de fosfato de sodio 20 mmol l⁻¹, por el método descrito por Lowry *et al.* (1951). Se utilizó albúmina de suero bovino (ASB) como patrón y la absorbancia se determinó a una longitud de onda de 750 nm.

Contenido de fenoles solubles

La extracción de los fenoles solubles se realizó en 10 volúmenes de metanol. Las muestras (100 mg) fueron homogenizadas y centrifugadas a 10 000 rpm (Gurr *et al.*, 1992). Para la determinación de la concentración de fenoles (mg g⁻¹ masa fresca) se utilizó el ácido clorogénico (0.05 mol l⁻¹) como patrón y los valores de absorbancia fueron determinados a 725 nm.

Contenido de flavonoides, terpenoides y antocianinas

El contenido relativo de flavonoides, terpenoides y antocianinas se determinó cualitativamente en 100 mg de tejido foliar fresco por plántula, los cuales fueron triturados en etanol al 96%. Los extractos se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min e inmediatamente se realizaron las determinaciones fitoquímicas según la metodología descrita por Chigodi *et al.* (2013):

Prueba para flavonoides: se adicionó 1 ml de NaOH 0.1 mol l⁻¹ a 100 mg de extracto y posteriormente se adicionó igual volumen de HCl 0.1 mol l⁻¹. La presencia de un color amarillo en la solución que desaparece indicó la presencia de flavonoides.

Prueba para terpenoides: se mezclaron 100 mg de extracto con 1 ml de cloroformo y a continuación se adicionaron 2 ml de H₂SO₄ concentrado. Una coloración rojo-pardo en la interfase indicó la presencia de terpenoides.

Prueba para antocianinas: se mezclaron 100 mg de extracto con 3 ml de agua destilada y posteriormente se adicionó 1 ml de HCl 2 mol l⁻¹ y solución amoniacal 2 mol l⁻¹ a 1 ml de la mezcla anterior. La presencia de un color rosado-rojo que se torna azul-violeta indicó la presencia de antocianinas.

Se realizaron tres mediciones de las absorbancias de cada vial en un colorímetro para la determinación de clorofilas, carbohidratos solubles totales, azúcares reductores, proteínas solubles totales y fenoles solubles. En el caso del contenido de flavonoides, terpenos y antocianinas se realizó de manera cualitativa a través del sistema no paramétrico de cruces (+++ = contenido alto, ++ = moderado, + = bajo, - = ausencia).

Además, se realizó un estudio histológico y se describieron los cambios de la epidermis en las plántulas. Para ello, se realizaron desprendimientos epidérmicos por la técnica descrita por Rodés y Collazo (2006). Se seleccionaron porciones de aproximadamente 1.5 de la epidermis abaxial y se utilizó un microscopio óptico (NOVEL) para la observación a 100 y 400x. Finalmente se tomaron microfotografías de las muestras obtenidas.

Para la transferencia a condiciones *ex vitro*, las plantas se lavaron con agua corriente para eliminar el agar y se procedió a una inmersión en CuSO_4 ($200 \mu\text{mol l}^{-1}$) durante 60 minutos para el control de hongos. Posteriormente se plantaron en bandejas de polietileno con un sustrato compuesto por pulpa de henequén descompuesta y gravilla de diámetro promedio igual a 2 mm en una relación 3:1 (v/v) y una densidad de 1.73 g cm^{-3} . La temperatura osciló entre 24 y 30°C de acuerdo con las condiciones ambientales en el mes de abril de 2015.

La aclimatación *ex vitro* de las plantas se desarrolló en casa de cultivo con manejo de la intensidad luminosa, a través de diferentes condiciones creadas con el empleo de capas de malla Sarán de color negro. Durante los primeros 15 días se redujo la intensidad luminosa al 70% y en las últimas dos semanas las plántulas fueron transferidas a un área con una reducción del 30%. El riego se realizó mediante un aspersor manual con intervalos de una hora en el período comprendido de 10:00 am a 3:00 pm, con lo cual se proporcionó una humedad relativa del 70% durante los primeros 15 días y del 60% en los restantes 15 días. El control se realizó con un hidrotérgrafo tipo VEP.

Se cuantificó el número de plantas vivas y se calculó el porcentaje de supervivencia de las plantas a los 30 días de cultivo.

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados con el paquete Statgraphic plus 5.1 sobre Windows. Se determinó el ajuste a una distribución normal mediante la prueba de bondad de ajuste Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Bartlett (Sigarra, 1985). Se realizó un ANOVA de clasificación simple para $p \leq 0.05$ y $p \leq 0.01$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización bioquímica de las plantas indicó que el tiempo de enraizamiento *in vitro* influyó en los contenidos de los compuestos analizados (Tabla 1). Se comprobó que hubo una disminución significativa en la concentración de clorofilas totales en las plantas enraizadas durante cinco meses con en comparación con las que permanecieron un mes en medio de cultivo de enraizamiento.

La disminución en los niveles de clorofilas puede estar asociada a una reducción en la biosíntesis de estos pigmentos o a un incremento de su degradación (Meher *et al.*, 2013). La disminución del potencial hídrico en el medio de cultivo pudo generar condiciones de estrés oxidativo debido a un aumento en la concentración de las especies reactivas del oxígeno (Gill y Tuteja, 2010; Krelavski *et al.*, 2012). La acción de estos radicales reactivos como el anión hidroxilo, provoca la oxidación

Tabla 1. Caracterización bioquímica de plantas de *A. fourcroydes* cv. 'Sac Ki' aclimatizadas *in vitro*.

Compuesto	Aclimatizadas <i>in vitro</i>	Control
Clorofila a (mg ml^{-1})	17.38 ± 0.57	$47.99 \pm 2.7a$
Clorofila b (mg ml^{-1})	3.88 ± 0.99	7.86 ± 1.28
Clorofilas totales (mg ml^{-1})	25.92 ± 0.05	$71.78 \pm 5.35a$
Carbohidratos totales (mg ml^{-1})	9.82 ± 0.59	$21.15 \pm 0.53ab$
Azúcares reductores (mg ml^{-1})	3.36 ± 0.20	$13.01 \pm 0.71ab$
Proteínas solubles totales (mg ml^{-1})	$18.47 \pm 0.27ab$	13.99 ± 0.33
Fenoles solubles (mg g^{-1} masa fresca)	$35.51 \pm 0.62ab$	23.78 ± 0.41
Flavonoides	+++	+
Terpenos	+++	++
Antocianinas	+	-

a Indica diferencia significativa según ANOVA de clasificación simple para $p \leq 0.05$. ab Indica diferencia significativa según ANOVA de clasificación simple para $p \leq 0.01$. Contenido: +++= alto, ++= moderado, += poco, - = ausencia. Control: plantas *in vitro* enraizadas durante 30 días.

de clorofilas, proteínas y lípidos de membrana, lo cual genera inestabilidad en los complejos proteína-pigmentos presentes en los fotosistemas y las membranas tilacoidales donde tiene lugar la fotosíntesis (Achary *et al.*, 2015; Del Rio, 2015). La degradación de los pigmentos clorofílicos también ha sido relacionada con un aumento de la actividad clorofilasa, que destruye estos pigmentos al separar el fitol del anillo tetrapirrólico en la molécula (Jamil *et al.*, 2012). Otro factor que pudo incidir fue el agotamiento de magnesio en el medio, el cual es un constituyente estructural de las clorofilas (Barceló *et al.*, 2002). Sin embargo, se requieren otros estudios para validar estas hipótesis en el cultivo de henequén.

De igual forma, las concentraciones de carbohidratos solubles totales y azúcares reductores fueron inferiores (Tabla 1). Esto puede estar asociado con el agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo, en particular los azúcares, lo cual puede provocar que las plántulas utilicen las reservas energéticas de los tejidos en función del mantenimiento de la homeostasis celular. En condiciones de estrés por déficit de nutrientes, ocurre un aumento de la respiración de mantenimiento para generar energía metabólica en función de incrementar la síntesis de proteínas transportadoras de membrana y lograr un aumento en la absorción de los nutrientes (Barceló *et al.*, 2002).

Sin embargo, las plantas con mayor tiempo de enraizamiento (aclimatizadas *in vitro*) mostraron un aumento significativo en el contenido de proteínas solubles totales, fenoles solubles, flavonoides, terpenos y antocianinas (Tabla 1). En relación con el contenido de proteínas solubles, estos resultados no coinciden con los obtenidos por Pant *et al.* (2014) quienes refirieron una disminución en la concentración de proteínas totales en plantas de *Trigonella foenum-graecum* L. var. 'RMt-303' sometidas a estrés hídrico.

El aumento en los niveles de proteínas observado en el presente trabajo puede estar relacionado con un mecanismo antiestrés para compensar la diferencia de potencial osmótico entre los tejidos de la planta y el medio de cultivo. De esta manera la planta puede reducir la pérdida de agua en un medio con déficit

hídrico. Esto concuerda con otros autores quienes han encontrado un incremento en las concentraciones de proteínas y aminoácidos en plantas sometidas a estrés hídrico y salino (Sunita *et al.*, 2014).

El aumento en la concentración de polifenoles solubles, flavonoides, terpenos y antocianinas pudo estar relacionado con una respuesta antioxidante de las plantas frente a condiciones de estrés. Los compuestos polifenólicos han sido descritos como agentes antioxidantes potentes, los cuales pueden contribuir a restablecer el estado redox celular (Zubair *et al.*, 2013; Jain *et al.*, 2015; Kendir y Korođlu, 2015).

Los resultados coinciden con estudios realizados en *Trifolium repens* L., donde se observó un aumento en las concentraciones de flavonoles en condiciones de estrés por déficit hídrico (Hofmann *et al.*, 2003). De manera similar, se observaron niveles constitutivamente elevados de flavonoles y antocianinas en diferentes variedades y ecotipos de esta especie, que mostraron una mayor tolerancia a sequía y a estrés por luz ultravioleta (Hofmann, 2003). Esto indica que niveles elevados de metabolitos fenilpropanoides pudieran tener una función protectora contra estreses abióticos en estas plantas (Dixon y Paiva, 1995).

De igual forma, el agotamiento de los nutrientes y el ácido naftalenacético en el medio de cultivo de enraizamiento también pudieron incidir en los cambios bioquímicos observados, ya que éstos pueden atenuar los efectos fisiológicos de los estreses abióticos (Khan *et al.*, 2012; Iqbal *et al.*, 2013). El azufre por ejemplo, es un componente estructural de numerosos compuestos como el glutatión, cuya forma reducida constituye un agente antioxidante eficaz, especialmente en condiciones de estrés (Szalai *et al.*, 2009).

El estudio histológico de la epidermis en las plantas mostró diferencias morfológicas (Figura 1). Los principales cambios con el tiempo de aclimatización *in vitro* estuvieron relacionados con un aumento del tamaño de las células epidérmicas típicas y un menor aguzamiento en los extremos, así como un incremento en el grosor de las paredes celulares y la presencia de estomas tetracíticos

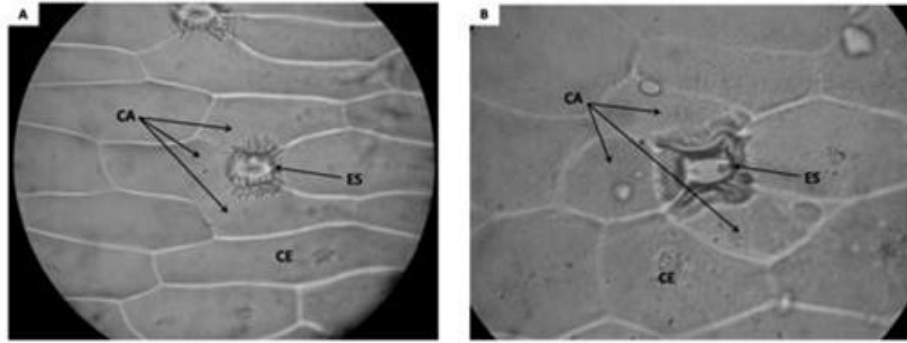


Figura 1. Epidermis abaxial de hojas de plantas de *A. fourcroydes* cultivar 'Sac Ki'. A, (400x) plantas con 30 días de enraizamiento *in vitro*, B (400x) plantas aclimatizadas *in vitro*, CA células acompañantes, ES: estoma, CE: célula epidérmica típica.

más desarrollados, lo que evidenció un mayor desarrollo del aparato estomático. Estos caracteres adaptativos se manifiestan normalmente en las plántulas durante la aclimatación *ex vitro* (González, 2001).

Las plantas aclimatizadas *in vitro* mostraron un porcentaje de supervivencia del 87% y alcanzaron las características fenotípicas deseadas para esta fase a los 25 días de cultivo. Estos resultados pueden estar relacionados con una preadaptación de las plantas durante un período de tiempo prolongado en la fase *in vitro*. Los cambios fisiológicos y bioquímicos desarrollados durante la aclimatación *in vitro* de las plantas pudieron contribuir a un mayor desarrollo y control del aparato estomático, del proceso de transpiración y del balance hídrico en las plántulas durante la etapa *ex vitro*. Otra característica anatómica que pudo influir en la supervivencia de las plantas fue el desarrollo de ceras epicuticulares que reducen la velocidad de transpiración (Hassanen y Khalil, 2013). Los valores de supervivencia fueron similares a los informados por Abreu (2009) en *Agave fourcroydes* Lem. con plantas *in vitro* de un mes en medio de cultivo de enraizamiento, pero utilizando una humedad relativa superior del 90%.

Las transformaciones fisiológicas como el desarrollo del aparato estomático en las plantas aclimatizadas *in vitro*, pudieron influir también en una reducción del tiempo de aclimatación de 25 días, en relación con los resultados informados por Abreu (2009) y Garriga *et al.* (2010) de 30 y 45 días respectivamente. Estos resultados pueden estar relacionados también con un incremento en el contenido de proteínas

y otros compuestos antioxidantes como los fenoles y los pigmentos antocianicos y flavonoides que pudieron contribuir a atenuar el período de estrés a que están sometidas las plantas cuando se exponen al ambiente *ex vitro* lo que incidió en una disminución en el tiempo de aclimatación con un porcentaje de supervivencia elevado sin necesidad de humedad relativa tan alta. No obstante, es necesario realizar estudios posteriores para verificar si estas características se traducen en mayor calidad de las posturas para su traslado a la fase de vivero y un análisis económico de la factibilidad de este proceso.

CONCLUSIONES

La aclimatación *in vitro* de plantas de *A. fourcroydes* cultivar 'Sac Ki' provoca cambios bioquímicos y fisiológicos que se caracterizan por una disminución en los contenidos de clorofilas, carbohidratos solubles totales y azúcares reductores así como un aumento de la concentración de proteínas solubles totales y metabolitos secundarios como fenoles solubles, terpenos, flavonoides, antocianinas y un mayor desarrollo del aparato estomático en comparación con plantas que solo fueron enraizadas.

REFERENCIAS

- Abreu EO (2009) Aclimatación 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. Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba
- Abreu E, González G, Ortiz R, Rodríguez P, Domech R, Garriga M (2007) Evaluación de vitroplantas de

- henequén (*Agave fourcroydes* Lem) durante la fase de aclimatización. *Cultivos Tropicales* 28 (1): 5-11
- Achary VM, Reddy CS, Pandey P, Islam T, Kaul T, Reddy MK (2015) Glutathione reductase a unique enzyme: molecular cloning, expression and biochemical characterization from the stress adapted C4 plant, *Pennisetum glaucum* (L.). *R Br Mol Biol Rep* 42(5): 947-962; doi: 10.1007/s11033-014-3832-z
- Aguilar ML, Espadas FL, Coello J, Maust BE, Trejo C, Robert ML, Santamaría JM (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
- Barceló J, Nicolás G, Sabater B, Sánchez R (2002) *Fisiología Vegetal*. Editorial Félix Varela, La Habana
- Chigodi MO, Samoei DK, Muthangya M (2013) Phytochemical screening of *Agave sisalana* Perrine leaves (waste). *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 4 (4): 200-204
- Del Rio LA (2015) ROS and RNS in plant physiology: an overview. *J Exp Bot* 66(10): 2827-2837
- Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7 (7): 1085-1097
- Dubois MK, Gilles A, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28 (3): 350-356
- García-Curbelo Y, Bocourt R, Savón LL, García-Vieyra MI, López MG (2015) Prebiotic effect of *Agave fourcroydes* fructans: an animal model. *Food Funct* 6 (9): 3177-3182
- Garriga M, González G, Alemán S, Abreu E, Quiroz K, Caligari P, García R (2010) Management of auxin-cytokinin interactions to improve micropropagation protocol of henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) Chilean *Journal of Agricultural Research* 70 (4): 545-551
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48 (12): 909-930
- 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, Matanzas, Cuba
- González G, Alemán S, Barredo F, Keb M, Ortiz R, Abreu E, Robert ML (2004) Una alternativa de la recuperación henequenera de Cuba, mediante el uso de técnicas biotecnológicas y moleculares. *Biotecnología Aplicada* 21(1): 44-49
- Gurr SI, McPherson MI, Bowles DJ (1992) Lignin and associated phenolic acids in cell walls. *Molecular Plant Pathology and Practical Approach* 3: 62-69
- Haghighi L, Majd A, Nematzadeh G, Shokri M, Kelij S, Irian S (2014) Salt-induced changes in cell wall peroxidase (CWPRX) and phenolic content of *Aeluropus littoralis* (Willd). *Parl AJCS* 8(2): 296-300
- Hassanen SA, Khalil RMA (2013) Biotechnological Studies for Improving of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) *in vitro* Plantlets. *Middle-East Journal of Scientific Research* 14(1):93-106
- Heidari A, Toorchi M, Bandehagh A, Shakiba MR (2011) Effect of NaCl Stress on Growth, Water Relations, Organic and Inorganic Osmolytes Accumulation in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Lines. *Universal Journal of Environmental Research and Technology* 1 (3): 351-362
- Hofmann RW, Campbell BD, Bloor SJ (2003) Responses to UV-B radiation in *Trifolium repens* L.: physiological links to plant productivity and water availability. *Plant, Cell & Environment* 26 (4): 603-612; doi: 10.1046/j.1365-3040.2003.00996.x
- Iqbal N, Masood A, Khan MIR, Asgher M, Fatma M, Khan NA (2013) Cross-talk between sulfur assimilation and ethylene signaling in plants. *Plant Signal Behav* 8 (1): 1-9
- Jain A, Sinha P, Jain A, Vavilala S (2015) Estimation of flavonoid content, polyphenolic content and antioxidant potential of different parts of *Abrus precatorius* (L.). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7(8):157-163
- Jamil M, Bashir S, Anwar S, Bibi S, Bangash A, Ullah F, Shikrha E (2012) Effect of salinity on physiological and biochemical characteristics of different varieties of rice. *Pakistan Journal of Botany* 44 (1): 7-13
- Kadlecek P, Tichal, Haisel D, Capkova V, Schafer C (2001) Importance of *in vitro* pretreatment for *ex vitro* acclimatization and growth. *Plant Science* 161 (4):695-701
- Kendir G, Körođlu A (2015) *In vitro* antioxidant effect of the leaf and branch extracts of *Ribes* L. species in Turkey. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Research* 2(108): 1-6
- Khan N, Nazar R, Iqbal N, Anjum N (2012) *Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants*. Springer Heidelberg Dordrecht, London; ISBN: 978-3-642-25829-9

- Krelavski V, Allakhverdiev Los DA, Kuznetsov VIV (2012) Signalling role of reactive oxygen species in plants under stress. *Russian Journal Plant Physiology* 59 (2): 141-154
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 (1): 265–275
- Mahdia FG, Abd-Alla MM (2010) Micro Propagation of *Phoenix dactylifera* L. var karama. *New York Science* 3(12): 64-69
- Mehar F, Khan MIR, Massod A, Khan NA (2013) Coordinate changes in assimilatory sulfate reduction are correlated to salt tolerance: involvement of phytohormones. *Annual Review and Research in Biology* 3 (3): 267-295
- Mervat ShS, Dawood MG (2014) Role of ascorbic acid and á tocopherol in alleviating salinity stress on flax plant (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Stress Physiology & Biochemistry* 10 (1): 93-111
- Miller G (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31 (3): 426-428
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473 – 497
- Pant NC, Agarrwal R, Agrawal S (2014) Mannitol-induced drought stress on calli of *Trigonella foenum-graecum* L. var. R Mt-303. *Indian Journal of Experimental Biology* 52 (11): 1128-1137
- Posada L, Montesinos YP, Olmedo JG, Barbón R, Rodríguez R, Norman O, Rodríguez RC, Daniels D, Gómez-Kosky R (2016) Effect of phloroglucinol on rooting and *in vitro* acclimatization of papaya (*Carica papaya* L. var. Maradol Roja). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* 52 (2): 196–203; doi:10.1007/s11627-015-9733-6
- Pérez-Santiago, R, Enríquez-del Valle JR, Castañeda-Hidalgo E, Velasco-Velasco VA, Rodríguez-Ortiz G, Campos-Ángeles G (2014) Dosis de fertirriego durante la aclimatización de plantas de *Agave americana* micropropagadas. *Revista Mexicana de Agroecosistemas* 1 (1): 20-27
- Rodés GR, Collazo OM (2006) Manual de Prácticas de Fotosíntesis. Universidad Autónoma de México, México DF; ISBN: 970-32-3313-9
- Sabra A, Daayf F, Renault S (2012) Differential physiological and biochemical responses of three Echinacea species to salinity stress. *Scientia Hort* 135 (24): 23-31
- Sigarroa A (1985) Biometría y diseño experimental. Editorial Pueblo y Educación, La Habana
- Sunita K, Srivastava M, Abbasi P (2014) Response of *Tephrosia purpurea* L. to salinity stress in relation to germination, carotenoid content and proline content. *Biolife* 2 (1): 276-281
- Szalai G, Kellos T, Galiba G, Kocsy G (2009) Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *J Plant Growth Regul* 28: 66-80
- Wintermans JF, de Mots A (1965) Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochim Biophys Acta* 109 (2): 448-453
- Xu H, Sun X, Wang X, Shi Q, Yang X, Yang F (2011) Involvement of a cucumber MAPK gene (CsNMAPK) in positive regulation of ROS scavengence and osmotic adjustment under salt stress. *Sci Hortic* 127 (4): 488-493
- Zubair SM, Rasool N, Mansha A, Anjum F, Munawar I, Muhammad M, Muhammad S (2013) Antioxidant, antibacterial, antifungal activities and phytochemical analysis of dagger (*Yucca aloifolia*) leaves extracts. *Journal of Medicinal Plants Research* 7 (6):243-249

Recibido: 06-09-2016

Aceptado: 03-11-2016