

## Aclimatación de *Agave americana* var. *Oaxacensis* obtenidas *in vitro*\*

## Acclimation of *Agave americana* var. *Oaxacensis* obtained *in vitro*

Elvia Yescas Arreola<sup>1</sup>, Gisela V. Campos Ángeles<sup>1§</sup>, José Raymundo Enríquez del Valle<sup>1</sup>, Vicente A. Velasco Velasco<sup>1</sup>, Gerardo Rodríguez Ortiz<sup>1</sup> y Judith Ruiz Luna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>División de Estudios de Postgrado e Investigación- Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Ex Hacienda de Nazareno, Xoxocotlán Oaxaca. C. P. 71230. Tel: 01 (951) 5170444. (elvia\_year@hotmail.com; jenriquezdelvalle@yahoo.com; vicvel5@hotmail.com; geraro65@gmail.com). <sup>§</sup>Autora para correspondencia: giscampos@hotmail.com.

### Resumen

Debido a la importancia de *Agave americana* variedad *oaxacensis* como materia prima para la elaboración artesanal de mezcal. Se evaluó durante 245 días el crecimiento de 260 plantas micropropagadas que tenían en promedio: 4.6 hojas, 10.1 cm de altura en la hoja más larga (AHML), 8.5 cm de diámetro de corona (DC) y 20.1  $\mu\text{g cm}^{-2}$  de clorofila en lámina foliar (CL). Las plantas se establecieron de acuerdo con un diseño completamente al azar con arreglo factorial (4 x 5), utilizando macetas de 300  $\text{cm}^3$  con cuatro diferentes sustratos: arena (1), arena-vermiculita (1:1), arena-turba (1:1) y arena-vermiculita-turba (1:1:1), aplicando diariamente riego con cinco diferentes composiciones 1) agua y 2) alguna alícuota: 25, 50, 75 y 100% de la solución universal Steiner. Cada tratamiento, tuvo diez repeticiones de una maceta con una plata cada una. Los primeros 49 días permanecieron en invernadero con humedad relativa alta y radiación solar disminuida al 50%. Los últimos 196 días en invernadero bajo radiación solar plena, ventilación y humedad relativa menor. Se realizó el análisis de varianza para los factores principales después de las primeras cinco semanas y, al final del experimento se realizó para todos los tratamientos, además de la comparación de medias (Tukey,  $p \geq 0.05$ ). El mayor incremento en AHML (1.63 cm), número de hojas (NH) (0.81), DC (1.17 cm) y CL (6.50  $\mu\text{g cm}^{-2}$ ) lo

### Abstract

Because of the importance of *Agave americana* variety *oaxacensis* as raw material for the craftsmanship of mezcal. The growth of 260 micro-propagated plants was evaluated during 245 days having on average: 4.6 leaves, 10.1 cm in the longest leaf (AHML), 8.5 cm in diameter crown (DC) and 20.1  $\text{g cm}^{-2}$  chlorophyll leaf blade (CL). The plants were established according to a completely randomized design with factorial arrangement (4 x 5), using pots of 300  $\text{cm}^3$  with four different substrates: sand (1), sand-vermiculite (1:1), sand-peat (1:1) sand and peat-vermiculite (1:1:1), using daily irrigation with five different compositions 1) water and; 2) some aliquot: 25, 50, 75 and 100% of the universal solution Steiner. Each treatment, had ten repetitions of a pot with a silver each. The first 49 days remained in a greenhouse with high relative humidity and solar radiation decreased 50%. The last 196 days under full sunlight greenhouse, ventilation and lower relative humidity. The analysis of variance for the main factors was performed after the first five weeks and at the end of the experiment was performed for all treatments, in addition to the comparison of means (Tukey,  $p \geq 0.05$ ). The largest increase in AHML (1.63 cm), number of leaves (NH) (0.81), DC (1.17 cm) and CL (6.50  $\text{g cm}^{-2}$ ) what caused

\* Recibido: enero de 2016  
Aceptado: mayo de 2016

provocó el sustrato arena-turba sin fertilización. Las plantas micropropagadas presentan sustitución de hojas entre los 35 y 70 días de aclimatación.

**Palabras clave:** *Agave americana* var. *Oaxacensis* L., clorofila, micropropagación, sustrato, solución Steiner.

## Introducción

*Agave americana* L. var. *Oaxacensis* L. es una especie silvestre que se utiliza para elaborar mezcal, que es una actividad estratégica para la economía del estado de Oaxaca, México. Sus poblaciones son escasas, pequeñas y fragmentadas; se encuentran en lugares aislados y han sido disminuidas considerablemente, al grado de no aparecer oficialmente en las cifras de producción del Consejo Regulador del Mezcal (CRM) 2015.

Los productores la aprecian por el tamaño de su tallo de más de 100 kg y su contenido de azúcares, por lo que es una necesidad imperante generar un esquema de propagación que asegure a los productores contar con suficiente materia prima de esta especie en un lapso de tiempo menor que el que implica el esquema tradicional. Según Monja-Mio (2015), el cultivo *in vitro* representa un método efectivo para la producción masiva de plantas libres de patógenos y que al mismo tiempo permite la selección de los individuos más vigorosos, al respecto, Aureoles *et al.* (2008), y Domínguez *et al.* (2008), agregan que en algunos casos permite el rescate, la conservación y multiplicación de especies amenazadas o en peligro de extinción.

El cultivo *in vitro* es sólo un logro parcial en el esquema de propagación, ya que las plantas que se obtienen presentan características morfológicas y funcionales de acuerdo con las condiciones favorables que predominan, por lo que no están preparadas para enfrentar los cambios bruscos que implica su climatización *ex vitro* durante la que se debe lograr su sobrevivencia. Y posteriormente la adaptación en de los nuevos individuos en un vivero, para enfrentar con éxito su establecimiento en el campo. Varios autores (Martínez *et al.*, 2005; Abreu *et al.*, 2007; Monja-Mio, 2015) coinciden al señalar que dentro de las características que presentan están su baja capacidad fotosintética debido a los bajos contenidos de pigmentos ya que los cloroplastos presentan granas desorganizadas; la ausencia de cutículas cerosas, estomas poco funcionales debido a la alteración en

the sand-peat without fertilizer substrate. The micro-propagated plants are replacing sheets between 35 and 70 days acclimatization.

**Keywords:** *Agave americana* var. *Oaxacensis* L., chlorophyll, micropropagation, substrate, Steiner solution.

## Introduction

The *Agave americana* L. var. *Oaxacensis* L. is a wild species used for mezcal, which is a strategic activity for the economy of the state of Oaxaca, Mexico. Small populations, small and fragmented; are in isolated areas and have been diminished considerably, to the extent not officially appear in the production figures Mezcal Regulatory Board (CRM) 2015.

The producers appreciate the size of the stem of more than 100 kg and sugar content, so it is a pressing need to generate a schema propagation to ensure producers have enough raw material of this kind in a span of less time than the traditional scheme involves. According Monja-Mio (2015), *in vitro* culture represents an effective method for mass production of pathogen-free plants and at the same time allows the selection of the most vigorous regard, individuals Aureoles *et al.* (2008), and Domínguez *et al.* (2008), adding that in some cases allows rescue, conservation and multiplication of threatened or endangered.

The *in vitro* culture is only a partial achievement in the scheme spread as the plants obtained show morphological and functional characteristics according to the favorable conditions prevailing, so they are not prepared to deal with sudden changes involving its air conditioning during *ex vitro* to be achieved survival. And then the adaptation of new individuals in a nursery, to successfully meet their establishment in the field. Several authors (Martínez *et al.*, 2005; Abreu *et al.*, 2007; Monja-Mio, 2015) alike say they are within the characteristics shown by its low photosynthetic capacity due to low content of pigments as chloroplasts present granas disorganized; the absence of waxy cuticles, very functional stomata due to alteration in the shape of the guard cells, different from the normal distribution, inefficiency tissues livelihood due to the reduced presence of clenchyma and esclerenquima, absorption and transport of inefficient water due to incomplete or weak vascular connection between the root and the bud, which differ from those plants obtained by conventional methods.

la forma de las células oclusivas, con distribución diferente a la normal, ineficiencia de los tejidos de sustento debido a la reducida presencia de clorénquima y esclerénquima, absorción y transporte de agua ineficiente debido a una conexión vascular incompleta o deficiente entre la raíz y el brote, que difieren de aquellas plantas que se obtienen mediante métodos convencionales.

Por lo anterior, la aclimatación de las plantas es la etapa decisiva debido al estrés al que son sometidas las plantas, de ella depende el éxito o fracaso de todo el proceso (Ortiz, 2000; Olmos *et al.*, 2004). Durante la aclimatación hay condiciones de menor humedad relativa, mayor variación de temperatura, alta irradiación, y menor disponibilidad de nutrimentos, por lo que se debe considerar: 1) su establecimiento dentro de un invernadero; 2) usar sustratos con buena retención de humedad, buen drenaje y aireación; 3) mantener la temperatura en el rango de 15 a 28 °C, 4) cambiar de manera gradual de alta (90%) a menor (40-60%) humedad relativa en el transcurso de 30 a 50 días; 5) incrementar la radiación solar de 50% al inicio a radiación solar plena; y 6) abastecimiento adecuado de nutrimentos. Las condiciones anteriores promueven que las plantas desarrollen órganos con características físicas y funcionales que les permitan sobrevivir en el campo (Enríquez *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2005). Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del sustrato y la dosis de fertilización en la adaptación y desarrollo de plantas micropropagadas de *Agave americana* var. *Oaxacensis* L.

## Materiales y métodos

El estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, el invernadero de aclimatación y el invernadero de adaptación del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, situado en Xoxocotlán, Oaxaca, México. Se siguió el esquema de propagación *in vitro* descrita por Murashige (1974), modificado por Deberg y Maene (1981). Para la multiplicación de propágulos se usaron tejidos de tallo que se establecieron en frascos de 145 cm<sup>3</sup> con 25 mL de un medio de cultivo preparado con las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), 0.4 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg L<sup>-1</sup> de mio-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 1 mg L<sup>-1</sup> de benciladenina. El pH del medio se ajustó a 5.8 antes de agregar agar. Los cultivos se incubaron durante siete semanas bajo luz fluorescente blanca a 2000 lux de intensidad, con fotoperiodo de 16 horas y temperatura entre 6 y 30 °C.

Therefore, the acclimatization of plants is the decisive stage due to the stress they are subjected plants, it depends on the success or failure of the whole process (Ortiz, 2000; Olmos *et al.*, 2004). During acclimation no conditions of lower relative humidity, greater variation in temperature, high radiation, and reduced availability of nutrients, so should be considered: 1) their establishment in a greenhouse; 2) use substrates with good moisture retention, good drainage and aeration; 3) maintain the temperature in the range of 15 to 28 °C, 4) change gradually high (90%) to low (40-60%) relative humidity during 30 to 50 days; 5) increase solar radiation 50% at baseline to full sunlight; and 6) an adequate supply of nutrients. The above conditions encourage plants to develop bodies with physical and functional characteristics that allow them to survive in the field (Enriquez *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2005). Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of the substrate and fertilization in the adaptation and development of micro-propagated plants *Agave americana* var. *Oaxacensis* L.

## Materials and methods

The study was conducted in the laboratory of plant tissue culture, the greenhouse acclimatization and the greenhouse adaptation of the Technological Institute of Oaxaca Valley, located in Xoxocotlan, Oaxaca, Mexico. The *in vitro* propagation scheme described by Murashige (1974), as amended by Deberg and Maene (1981) was followed. For multiplication of propagules stem tissue that were established in flasks of 145 cm<sup>3</sup> with 25 mL of a culture medium prepared with mineral salts of Murashige and Skoog (1962) were used, 0.4 mg L<sup>-1</sup> thiamine, 100 mg L<sup>-1</sup> myo-inositol, 30 g L<sup>-1</sup> sucrose, 1 mg L<sup>-1</sup> benzyladenine. The pH of medium was adjusted to 5.8 before adding agar. The cultures were incubated for seven weeks under white fluorescent light at 2000 lux intensity, with photoperiod of 16 hours and temperatures between 6 and 30 °C.

After this period in each explant had formed groups of 5 to 12 adventitious shoots, those shoots that had 4 to 5 cm are individually separated to establish three in each flask of 145 cm<sup>3</sup> total volume, which had 20 cm<sup>3</sup> of medium culture to induce the formation of adventitious roots. The composition of the culture medium was used to that in the previous stage but without adding benzyladenine and 0.5 mg L<sup>-1</sup> of indole butyric acid (AIB). The cultures were

Transcurrido este período en cada explante se habían formado grupos de 5 a 12 brotes adventicios, aquellos brotes que tenían de 4 a 5 cm de altura se separaron individualmente para establecer tres en cada frasco de 145 cm<sup>3</sup> de volumen total, que tenían 20 cm<sup>3</sup> de medio de cultivo para inducir la formación de raíces adventicias. La composición del medio de cultivo fue a la que se usó en la etapa anterior pero sin benciladenina y agregando 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB). Los cultivos se incubaron durante cuatro semanas en condiciones similares que la etapa anterior. Se obtuvieron *in vitro* 400 plantas de *Agave americana* var. *oaxacensis* de las que se seleccionaron 260 que se transfirieron *ex vitro*, se lavaron con agua corriente para eliminar los restos de agar y fueron sumergidas durante cinco minutos en una solución de fungicida al 5% para evitar la proliferación de hongos en el invernadero. El experimento se estableció de acuerdo con un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4 x 5 (sustratos por dosis de fertilización), por lo que se tuvieron 20 tratamientos con 10 repeticiones. La unidad experimental fue una planta. Los análisis de varianza correspondientes se realizaron después de las primeras cinco semanas, a los 210 y a los 245 días, además de la comparación de medias (Tukey,  $p=0.05$ ).

Para aclimatar las plántulas, se trasplantaron a macetas de 6 x 6 x 5.5 cm (198 cm<sup>3</sup>) que contenían uno de los cuatro sustratos: arena (1), arena: vermiculita (1:1), arena: turba (1:1) y arena: vermiculita: turba (1:1:1). Las plántulas se colocaron durante 49 días en un invernadero que tenía condiciones de humedad relativa alta (80-90%), que se mantuvieron diariamente por medio de un sistema de riego intermitente por nebulización, de 10 s cada 12 min. de las 11:00 a las 14:00 h realizándose las atenciones culturales recomendadas para el cultivo (Murguía, 1993); radiación solar disminuida 50%. El total de plantas en cada sustrato se separaron en cinco grupos para aplicarles diariamente una condición de riego: 1) agua (testigo); 2) solución nutritiva (SN) 25%; 3) SN a 50%; 4) SN a 75 %; y 5) SN a 100% de fertilización líquida con solución Steiner (1984), aplicando 15 mL planta<sup>-1</sup> a nivel sustrato.

Durante cinco semanas y después de 210 y 245 días en condiciones *ex vitro* se registraron las variables: altura de la hoja más larga (cm), número de hojas, diámetro de corona (cm) y contenido de clorofila ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ ). Después de 49 días de aclimatación en el primer invernadero se trasladaron al invernadero de adaptación, que es de tipo túnel con cubierta de polietileno en donde se expusieron durante 196 días a radiación solar plena, ventilación y humedad relativa menor (40-60%); las plantas ya no recibieron riego por

incubated for four weeks under similar conditions as the previous step. The 400 were obtained *in vitro* plants *Agave americana* var. *oaxacensis* of which 260 were selected to *ex vitro* they were transferred, washed with tap water to remove traces of agar and were immersed for five minutes in a solution of fungicide 5% to prevent the proliferation of fungi in the greenhouse. The experiment was set according to a completely randomized design factorial arrangement 4 x 5 (substrates by fertilization) with, so 20 treatments with 10 repetitions had. The experimental unit was a plant. The corresponding analysis of variance after the first five weeks made, at 210 and 245 days in addition to the comparison of means (Tukey,  $p=0.05$ ).

To feed the seedlings, were transplanted into pots of 6 x 6 x 5.5 cm (198 cm<sup>3</sup>) containing one of the four substrates: sand (1), sand: vermiculite (1:1), sand: peat (1:1) and vermiculite: peat (1:1:1). The seedlings were placed for 49 days in a greenhouse that was under high relative humidity (80-90%), which remained daily through an intermittent irrigation nebulization of 10 s every 12 min. to 11:00 to 14:00 h performing the cultural care recommended for cultivation (Murguía, 1993); 50% solar radiation decreased. The total number of plants in each substrate were separated into five groups to apply daily irrigation condition: 1) water (control); 2) nutrient solution (SN) 25%; 3) SN to 50%; 4) SN to 75 %; y 5) SN to 100% liquid solution fertilization Steiner (1984), using 15 mL plant<sup>-1</sup> to substrate ground-level. For five weeks and after 210 and 245 days under *ex vitro* variables were recorded: height blade longer (cm), leaf number, crown diameter (cm) and chlorophyll content ( $\text{mg cm}^{-2}$ ). After 49 days of acclimatization in the first greenhouse they were transferred to the greenhouse adaptation, which is tunnel-type with polyethylene cover where they were exposed for 196 days at full solar radiation, ventilation and relative humidity lower (40-60%); plants no longer received irrigation misting but the risks to substrate level spaced every two days. When they passed the height of the longest leaf, leaf number, crown diameter and chlorophyll content for these features increases over the past 35 days recorded.

## Results and discussion

### Initial growth during acclimatization

When he finished the stage of *in vitro* cultivation of plants of *Agave americana* these, were on average 4.6 leaves, 10.1 cm in the longest leaf, 8.5 cm in diameter crown, and contained

nebulización pero sí los riegos a nivel sustrato espaciados cada dos días. Cuando transcurrieron se registró la altura de la hoja más larga, número de hojas, diámetro de corona y contenido de clorofila para obtener los incrementos de estas características durante los últimos 35 días.

## Resultados y discusión

### Crecimiento inicial durante la aclimatación

Cuando terminó la etapa del cultivo *in vitro* de las plantas de *Agave americana* éstas, tenían en promedio 4.6 hojas, 10.1 cm de altura en la hoja más larga, 8.5 cm de diámetro de corona, y contenían 20.1  $\mu\text{g cm}^{-2}$  de clorofila en lámina foliar. Después de cinco semanas las plantas presentaban diferencias estadísticamente significativas producidas por los factores principales. Tanto el sustrato como la dosis de fertilización y la interacción de ambos incidieron significativamente ( $p \leq 0.01$ ) sobre el incremento en la altura de la hoja más larga (AHML), el número de hojas (NH) y el diámetro de la corona (DC). Mientras el contenido de clorofila (CL) sólo mostró el efecto significativo ( $p \leq 0.01$ ) de la dosis de fertilización (Cuadro 1).

### Cuadro 1. Cuadrados medios y significancia del incremento de variables al término de las primeras cinco semanas de aclimatación de plantas micropropagadas de *Agave americana* var. *Oaxacensis* L.

Table 1. Mean squares and significance of increased variables at the end of the first five weeks of acclimatization of micropropagated plants *Agave americana* var. *Oaxacensis* L.

Fuente de variación	GL	AHML (cm)	NH	Dc (cm)	Clorofila ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )
Sust	3	1.5*	1.3*	20.4**	42.8 ns
DF	4	7.8**	5.9**	66.8**	563.1**
Sust*DF	12	1.8**	0.8*	18.2**	132.5 ns
Error	202				
Total	221				

Lo anterior puede deberse al proceso natural de aclimatación, ya que las plantas son obligadas a responder en un ambiente estresante, aunque estén bajo cierta protección, en el cual la disponibilidad de nutrientes tiene más restricciones que en el ambiente *in vitro*, por lo que responde de mejor manera a la dosis de fertilización, aprovechando los minerales que se proporcionan diluidos y en las formas químicas aprovechables por ellas al estar diluidos en el agua de riego. Tomando en cuenta que tiene poca capacidad para modificar su morfología, la única manera de aumentar su capacidad de

20.1  $\mu\text{g cm}^{-2}$  of chlorophyll sheet foliar. After five weeks the plants showed statistically significant differences produced by the main factors. Both the substrate and the fertilization and the interaction of both influenced significantly ( $p \leq 0.01$ ) on increasing the height of the longest leaf (AHML), the number of sheets (NH) and the diameter of the crown (DC). While chlorophyll content (CL) showed only significant ( $p \leq 0.01$ ) dose fertilization (Table 1).

This may be due to the natural process of acclimatization, since plants are obliged to respond in a stressful environment, even if they are under some protection where nutrient availability has more restrictions than in the *in vitro* environment, which responds better dose fertilization, using minerals are provided and diluted in chemical forms usable for them to be diluted in irrigation water. Given that has little ability to change their morphology, the only way to increase their photosynthetic capacity it is increasing its light gathering area, so the chlorophyll content remains unchanged. About Salazar *et al.* (2009) mention that achieved adapting *Agave cocui* Trelease and plants had normal morphology after one week.

As for the effect of the substrate it was observed that the plants established in the sand-peat substrate without fertilization showed greater increases in height of the longest leaf

and number of leaves (Table 2). The foregoing suggests that the content of organic matter in the soil promotes plant nutrition as it stabilizes the pH, increased water retention, drainage, cation exchange capacity and availability of nutrients, which is reflected in growing dedicated to photosynthesis organs to ensure their survival, on the other hand it is important to consider that possibly net photosynthesis is zero or may even have negative values due to the lack of control experienced by *in vitro* plants not being prepared to face conditions outside lab.

fotosíntesis es aumentando su área de captación de luz, por lo que el contenido de clorofila se mantiene sin cambios. Al respecto Salazar *et al.* (2009), mencionan que lograron la adaptación de *Agave cocui* Trelease y que las plantas presentaron morfología normal después de una semana.

En cuanto al efecto del sustrato, se observó que las plantas establecidas en el sustrato arena-turba y sin fertilización mostraron mayores incrementos en la altura de la hoja más larga, y en el número de hojas (Cuadro 2). Lo anterior, hace suponer que el contenido de materia orgánica en el sustrato favorece la nutrición de las plantas ya que estabiliza el pH, incrementa la retención de agua, el drenaje, la capacidad de intercambio catiónico y la disponibilidad de nutrimentos, lo que se refleja en el crecimiento de órganos dedicados a la fotosíntesis para asegurar su sobrevivencia, por otra parte es importante considerar que posiblemente la fotosíntesis neta sea cero o incluso pueda presentar valores negativos, debido al descontrol que sufren las vitro plantas al no estar preparadas para enfrentar condiciones fuera del laboratorio. Sin embargo, los nutrimentos disponibles no son suficientes para detonar además, la acumulación de sustancias de reserva y la acumulación de materia seca.

However, nutrients available are not sufficient to trigger further accumulation of reserve substances and dry matter accumulation.

It is noteworthy that the highest value for the diameter of the crown, was observed when plants were established in a sand substrate:- vermiculite and also received irrigation with a 25% solution of Steiner, the accumulation of dry matter can due to the vermiculite it contains potassium (K), magnesium (Mg) and calcium (Ca), although such plants relatively decreased increased height and number of leaves as the highest value for the last variable mentioned was recorded in the vermiculite substrate sand- plus 25% of nutrient solution. These results coincide with Enriquez *et al.* (2005), who mentioned that micropropagated plants of *Dendranthema grandiflora* not require the application of some mineral solution to show growth, draws attention to the results above seem to be influenced by the combination of sand and peat in some proportion in the substrate. This behavior seems logical considering that the tested plants are subject to some degree of stress caused by the sudden change in environmental conditions, because although apparently they change gradually to establish plants

**Cuadro 2. Medias de los incrementos por tratamientos de las primeras cinco semanas de aclimatación de *Agave americana* var. *Oaxacensis* L.**

**Table 2. Means of treatments increases for the first five weeks of acclimatization of *Agave americana* var. *Oaxacensis* L.**

Tratamiento		AHM (cm)	NH	DC (cm)	CL ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )
Sustrato	DF (%)				
Arena	0	1.6 ± 1.0 a	1.0 ± 0.6 a	5.0 ± 1.7 a	10.8 ± 10.8 a
Arena/vermiculita	0	0.6 ± 0.1 a	1.5 ± 0.9 a	4.4 ± 0.8 a	3.1 ± 7.1 b
Arena/turba	0	1.6 ± 1.3 a	2.0 ± 0.9 a	3.7 ± 1.1 a	6.7 ± 4.7 a
Arena/vermiculita/turba	0	1.0 ± 0.2 a	1.4 ± 0.7 a	4.8 ± 0.8 a	6.6 ± 3.9 a
Arena	25	0 ± 0 b	1.3 ± 0.8 a	4.6 ± 2.0 a	13.0 ± 11.8 a
Arena/vermiculita	25	0.5 ± 0.7 b	0.5 ± 0.7 b	5.3 ± 2.7 a	16.3 ± 11.2 a
Arena/turba	25	0.4 ± 0.7 b	0.4 ± 0.5 b	3.9 ± 2.2 a	16.7 ± 11.7 a
Arena/vermiculita/turba	25	0.6 ± 1.2 a	0.3 ± 0.4 b	5.1 ± 2.5 a	15.5 ± 12.7 a
Arena	50	0 ± 0 b	0.6 ± 0.7 b	3.3 ± 1.8 a	16.8 ± 12.5 a
Arena/vermiculita	50	0.0 ± 0.3 b	0.2 ± 0.4 b	3.3 ± 1.6 a	9.3 ± 11.1 a
Arena/turba	50	0 ± 0 a b	0.6 ± 0.7 b	5.0 ± 1.3 a	22.3 ± 10.7 a
Arena/vermiculita/turba	50	0.4 ± 1.3 b	0.5 ± 0.5 b	4.8 ± 2.2 a	13.9 ± 11.6 a
Arena	75	0.0 ± 0.1 b	0.9 ± 0.7 b	2.8 ± 3.1 a	11.0 ± 14.5 a
Arena/vermiculita	75	0.0 ± 0.1 b	0.5 ± 0.5 b	3.3 ± 2.1 a	14.7 ± 12.0 a
Arena/turba	75	0.0 ± 0.0 b	1.0 ± 0.3 a	2.4 ± 2.6 a	6.7 ± 5.4 a
Arena/vermiculita/turba	75	1.0 ± 0.8 a	0.7 ± 0.4 b	0.3 ± 0.9 b	8.8 ± 10.2 a
Arena	100	0.8 ± 1.7 a	0.8 ± 0.4 b	5.2 ± 4.0 a	11.4 ± 10.7 a
Arena/vermiculita	100	0.4 ± 0.3 b	0.6 ± 0.5 b	2.4 ± 3.4 a	11.0 ± 7.0 a
Aren/turba	100	0.0 ± 0.1 b	0.8 ± 0.5 b	0 ± 0 b	9.5 ± 12.0 a
Arena/vermiculita/turba	100	0.0 ± 0.0 b	0.5 ± 0.6 b	1.7 ± 2.3 b	8.5 ± 4.1 a

AHM= altura de la hoja mayor; NH= número de hojas; DC= diámetro de corona; CL= clorofila. Media aritmética + desviación estándar de diez observaciones. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Cabe resaltar que el valor más alto para el diámetro de la corona, fue observado cuando las plantas se establecieron en un sustrato arena:- vermiculita y además recibieron riego con una solución al 25% de la solución de Steiner, la acumulación de materia seca puede deberse a que la vermiculita contiene potasio (K), magnesio (Mg) y calcio (Ca) aunque dichas plantas disminuyeron relativamente el incremento en altura y el número de hojas, ya que el valor más alto para la última variable mencionada se registró en el sustrato arena-vermiculita más 25% de solución nutritiva. Estos resultados coinciden con Enríquez *et al.* (2005), quienes mencionan que plantas micropropagadas de *Dendranthema grandiflora* no requirieron la aplicación de alguna solución mineral para mostrar crecimiento, llama la atención que los resultados antes mencionados parecen estar influenciados por la combinación de arena y turba en alguna proporción en el sustrato. Este comportamiento parece lógico si se considera que las plantas evaluadas están sometidas a cierto grado de estrés provocado por el cambio brusco en las condiciones ambientales, ya que aunque aparentemente éstas cambian de manera gradual al establecer las plantas fuera del laboratorio, sufren un descontrol total, debido a que no cuentan con mecanismos que les permitan regular funciones básicas como el intercambio de gases, que también repercute en su estado hídrico.

Se observó que el número de hojas, altura de la hoja mayor, diámetro de corona y contenido de clorofila tuvieron un incremento constante durante las primeras cinco semanas, posteriormente las plantas empezaron a perder las hojas de mayor edad durante el periodo comprendido entre los 35 y 70 días de aclimatación. Estos resultados coinciden con los reportados por Abreu *et al.* (2007), quienes mencionan que plantas de *Agave fourcroydes* micropropagadas tuvieron una respuesta positiva en cuanto a crecimiento y desarrollo a partir de los 30 días de aclimatización. Por otra parte Monja-Mio *et al.* (2015), mencionan que las plantas de *Agave angustifolia* cultivadas *in vitro*, experimentan cambios severos en la morfología y superficie de la hoja durante la aclimatización, que los más notorios son el desarrollo del aparato estomático, la deposición de ceras epicuticulares, la formación de protuberancias y de cristales de óxido de calcio en la epidermis de la hoja, lo que logran después de tres meses. Lo anterior, coincide parcialmente con los resultados de este estudio, ya que a pesar del esfuerzo que realizaron las plantas para aclimatizarse, mostraron crecimiento en AHM y NH, así como la acumulación de materia seca al incrementar el DC durante las primeras cinco semanas. Por otra parte, algunos autores como Pospisilová *et al.* (1999); Obledo *et al.* (2004); Abreu *et al.* (2007); Enríquez (2008) y Monja-Mio

outside the lab, suffer a total lack of control, because they do not have mechanisms that allow them to regulate basic functions such as gas exchange, which also affects their water status.

It was observed that the number of sheets, up to the largest sheet, crown diameter and chlorophyll content were continuously increased during the first five weeks later the plants began to lose the older leaves during the period between 35 and 70 days of acclimatization. These results agree with those reported by Abreu *et al.* (2007), who mentioned that fourcroydes *Agave* plants micropropagated had a positive response in terms of growth and development after 30 days of acclimatization. Moreover Monja-Mio *et al.* (2015) mention that plants *Agave angustifolia* cultured *in vitro*, experience severe changes in morphology and leaf surface during acclimatization, the more noticeable are the development of stomatal, deposition epicuticular waxes, formation protuberances and calcium oxide crystals in the leaf epidermis, which achieved after three months. Which was partially coincides with the results of this study because despite the effort made by the plants to acclimatize, showed growth in AHM and NH, and the dry matter accumulation by increasing the DC during the first five weeks. Moreover, some authors like Pospisilova *et al.* (1999); Obledo *et al.* (2004); Abreu *et al.* (2007); Enríquez (2008) and Monja-Mio *et al.* (2015) agree that plants lose leaves during the process of acclimatization due to stress they suffer when they are transferred from the *in vitro* conditions to greenhouse conditions or field, as these plants do not have the anatomical and physiological features operate efficiently, preventing showing significant increases in growth and development, so that their efforts are channeled to the minimum processes to survival during this very critical stage. Regarding the acclimatization stage, Morales *et al.* (2009), indicate that is a period of time during which the plants are more susceptible to environmental stress. Preece and Sutter (1991), agree that should be adapted to have a continuous growth and development, to new environmental conditions such as lower relative humidity, with more light and septic substrates.

In many species of plants, leaves formed *in vitro* are unable to be further developed under greenhouse conditions and are replaced by new leaves (Pospisilova *et al.*, 1999). Enríquez (2008) mentions that plants *Agave angustifolia* replaced the leaves that had formed in the laboratory by new leaves in the acclimatization stage. This phenomenon occurs in plants

*et al.* (2015) coinciden en señalar que las plantas pierden hojas durante el proceso de aclimatación debido al estrés que padecen cuando son transferidas de las condiciones *in vitro* a las condiciones de invernadero o de campo, ya que estas plantas no poseen las características anatómicas y fisiológicas para funcionar de forma eficiente, lo que impide que muestren incrementos notables en crecimiento y desarrollo, por lo que sus esfuerzos se canalizan a los procesos mínimos que les permitan la sobrevivencia durante esta etapa sumamente crítica. Respecto a la etapa de aclimatización, Morales *et al.* (2009), señalan que es un periodo de tiempo durante el cual las plantas resultan más susceptibles al estrés ambiental. Preece y Sutter (1991), coinciden en que deben adaptarse para tener un crecimiento y desarrollo continuo, a nuevas condiciones ambientales como menor humedad relativa, con más luz y sustratos sépticos.

En muchas especies de vegetales, las hojas formadas *in vitro* son incapaces de seguirse desarrollando en condiciones de invernadero y son reemplazadas por hojas nuevas (Pospisilová *et al.*, 1999). Enríquez (2008) menciona que las plantas de *Agave angustifolia* sustituyeron las hojas que habían formado en laboratorio por hojas nuevas en la etapa de aclimatación. Este fenómeno que ocurre en las plantas generadas *in vitro*, son explicadas por Taiz y Zeiger (2002), como una respuesta específica que las plantas presentan para deshacerse de las partes no esenciales; es decir, tomando en cuenta que las hojas fueron formadas *in vitro*, bajo condiciones controladas en donde no es necesario desarrollar ninguna estrategia de adaptación, por lo que no son aptas para responder a los cambios que implica su aclimatación, por lo que funcionalmente es preferible translocar los componentes útiles y formar nuevas hojas con características morfológicas y funcionales que sustituyen a las anteriores.

Este tipo de plantas requieren de un proceso de adaptación al nuevo medio al cual se enfrentan, periodo de tiempo durante el que resultan más susceptibles al estrés ambiental para tener un continuo crecimiento y desarrollo (Morales *et al.*, 2009). Abreu *et al.* (2007), menciona que las plantas cultivadas *in vitro*, alteran su morfología, anatomía y fisiología como resultado del ambiente *in vitro*, por lo que durante la aclimatización presentan incapacidad para controlar varios procesos, entre los que destaca la pérdida de agua, por lo que su tasa de fotosíntesis es reducida, por lo que una respuesta específica de las plantas es deshacerse de las partes no esenciales y recuperar los nutrimentos presentes en esas partes, de las que se deshace para órganos esenciales para ellas.

generated *in vitro*, they are explained by Taiz and Zeiger (2002), as a specific response that plants have to get rid of non-essential parts; that is, taking into account that the leaves were formed *in vitro* under controlled conditions where it is not necessary to develop any adaptation strategy, so they are not able to respond to changes involving their acclimatization, so it is functionally preferable translocate useful components and form new leaves with morphological and functional characteristics that replace the previous ones.

Such plants require a process of adaptation to the new environment which, during the period of time that are more susceptible to environmental stress to have a continuous growth and development face (Morales *et al.*, 2009). Abreu *et al.* (2007) mentions that plants grown *in vitro*, alter their morphology, anatomy and physiology as a result of the environment *in vitro*, so during the acclimation present inability to control various processes, among which water loss, so their rate of photosynthesis is reduced, so that a specific response of plants is to get rid of non-essential parts and recover the nutrients present in these parts, of which melts to essential organs for them.

### **Growth at the end of the adaptation stage**

Plants with age 210 to 245 days showed that the factor fertilization had no significant effect on the growth of the height of the longest leaf (AHML), however influenced the increase in crown diameter, number of leaves and chlorophyll content ( $p \geq 0.05$ ). Plants that were established in the sand-peat substrate and fertigation to 50% concentration of nutrients of the Steiner solution showed greater increases in height of the longest leaf and number of leaves that plants were established in other substrates and were applied to other doses of fertilizers in regard to the number of sheets, they had higher concentrations increased with 75% solution. Furthermore, the plants established vermiculite substrate and irrigated with water only showed greater increases in crown diameter. These results agree with those reported by Enriquez *et al.* (2005), which mentioned that during the acclimation of plants *Dendranthema grandiflora* micropropagated and settled on a substrate with high content of organic matter not required to be applied mineral solution to show growth, while plants fertigation 50% had further increases of chlorophyll in the leaves (Table 3). This means that the more nutrients



### Crecimiento al final de la etapa de adaptación

Las plantas con edad de 210 a 245 días mostraron que el factor dosis de fertilización no tuvo efectos significativos en el crecimiento de la altura de la hoja más larga (AHML), sin embargo influyó en el incremento en el diámetro de corona, número de hojas y contenido de clorofila ( $p \geq 0.05$ ). Las plantas que se establecieron en el sustrato arena-turba y se fertirrigaron a 50% de concentración de nutrimentos de la solución Steiner mostraron mayores incrementos en altura de la hoja más larga y el número de hojas que las plantas que se establecieron en otros sustratos y que se les aplicaron otras dosis de fertilizantes, en lo que respecta al número de hojas, tuvieron mayor incremento con concentraciones al 75% de solución. Por otro lado, las plantas establecidas en el sustrato vermiculita y que se irrigaron con solo agua mostraron mayores incrementos en diámetro de corona. Estos resultados coinciden con los reportados por Enríquez *et al.* (2005), que mencionan que durante la aclimatación de plantas de *Dendranthema grandiflora* micropropagadas y que se establecieron en un sustrato con alto contenido de materia orgánica no requirieron que se le aplicara solución mineral para mostrar crecimiento, mientras que las plantas fertirrigadas a 50% tuvieron mayores incrementos de clorofila en las hojas (Cuadro 3). Esto significa que, mientras más nutrimentos tenga la hoja, tendrá mayor concentración, pero sin exceso de nutrientes por parte del sustrato como lo mencionan Enríquez *et al.* (2005).

has the blade, will have more concentration, but without excess nutrients from the substrate as mentioned Enríquez *et al.* (2005).

Established plants in peat substrate showed greater increases in height of the longest and crown diameter blade, this is because the peat has characteristics that are close to an ideal substrate: aeration capacity, 10 to 20%; water retention, 55 to 70%; granulometry 2.25 mm 0.25; bulk density  $< 0.4 \text{ g cm}^{-3}$ ; total pore water readily available 48% and 93% space (Urresatarazu, 2000, Iskander, 2002). While established plants in vermiculite substrate, showed that the number of irrigated leaves with 75% Steiner solution and the content of irrigated chlorophyll with 50% had greater increases, therefore neither the substrate had a high concentration of nutrients nor solution dose was very high. Which can be attributed to the characteristics of vermiculite, and that has a high cation exchange capacity which facilitates mobility and absorption of ions in chemical forms to keep available.

In the period of 210-245 days after transplantation, the plants no longer showed senescence of leaves as occurred during the period between 40 to 60 days, because at this age already had new leaves that had developed in the *ex vitro* environment (Martinez *et al.*, 2005). Therefore, also it increased crown diameter, the height of the largest sheet and therefore chlorophyll content was constant.

### Cuadro 3. Incremento en las características de plantas durante los 210 a 245 días de aclimatación en función de niveles de factores principales.

Table 3. Increase in the characteristics of plants during the 210-245 days of acclimatization levels according main factors.

Factores principales	AHML (cm)	Núm. de hojas	Dc (cm)	CL ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )
Sustrato				
Arena	$0.9 \pm 0.7 \text{ b}$	$0.6 \pm 0.7 \text{ a}$	$1.1 \pm 0.6 \text{ b}$	$4.2 \pm 6.5 \text{ a}$
Arena/vermiculita	$0.6 \pm 0.7 \text{ b}$	$1.0 \pm 1.6 \text{ a}$	$1.5 \pm 2.7 \text{ a}$	$5.8 \pm 7.1 \text{ a}$
Arena/turba	$1.5 \pm 1.3 \text{ a}$	$1.0 \pm 1.2 \text{ a}$	$2.9 \pm 6.4 \text{ a}$	$3.7 \pm 6.0 \text{ a}$
Arena/vermiculita/turba	$0.9 \pm 0.9 \text{ b}$	$0.6 \pm 0.7 \text{ a}$	$1.2 \pm 0.5 \text{ b}$	$5.3 \pm 7.8 \text{ a}$
Dosis de fertilización (%)				
0	$0.8 \pm 0.7 \text{ a}$	$0.3 \pm 0.6 \text{ b}$	$2.9 \pm 6.8 \text{ a}$	$1.4 \pm 4.0 \text{ b}$
25	$0.8 \pm 0.8 \text{ a}$	$0.7 \pm 0.7 \text{ b}$	$1.2 \pm 0.6 \text{ a}$	$2.1 \pm 4.6 \text{ b}$
50	$1.1 \pm 1.1 \text{ a}$	$0.6 \pm 0.6 \text{ b}$	$0.9 \pm 0.3 \text{ b}$	$8.0 \pm 7.6 \text{ a}$
75	$1.1 \pm 1.0 \text{ a}$	$1.3 \pm 1.5 \text{ a}$	$1.4 \pm 0.4 \text{ a}$	$7.1 \pm 6.8 \text{ a}$
100	$1.1 \pm 1.1 \text{ a}$	$1.1 \pm 1.4 \text{ a}$	$1.6 \pm 1.0 \text{ a}$	$6.1 \pm 8.5 \text{ a}$

AHML= altura de la hoja más larga. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Las plantas establecidas en el sustrato turba mostraron mayores incrementos en altura de la hoja más larga y diámetro de corona, esto se debe a que la turba posee características que se acercan al de un sustrato ideal:

Gonzalez *et al.* (2007), they worked with fourcroydes *Agave* and report that the 42 days of acclimatization, the leaves were already considered functional with normal stomata and waxes on its cover. These results

capacidad de aireación, 10 a 20%; retención de agua, 55 a 70%; granulometría de 0.25 a 2.25 mm; densidad aparente  $<0.4 \text{ g cm}^{-3}$ ; agua fácilmente disponible de 48% y espacio poroso total de 93% (Urresatarazu, 2000, Iskander, 2002). Mientras que las plantas establecidas en el sustrato vermiculita, mostraron que el número de hojas irrigadas con 75% de solución Steiner y el contenido de clorofila irrigadas con 50% tuvieron mayores incrementos, por lo tanto ni el sustrato tenía una alta concentración de nutrientes ni la dosis de solución fue muy alta. Lo que puede ser atribuido a las características de la vermiculita, ya que tiene una alta capacidad de intercambio catiónico que facilita la movilidad y absorción de los iones al mantenerlos en formas químicas disponibles.

En el lapso de 210 a 245 días posteriores al trasplante, las plantas ya no mostraron la senescencia de las hojas como ocurrió durante el lapso entre los 40 a los 60 días, debido a que a esta edad ya poseían hojas nuevas que habían desarrollado en el ambiente *ex vitro* (Martínez *et al.*, 2005). Por lo tanto, también incrementó el diámetro de corona, la altura de la hoja mayor y por consiguiente el contenido de clorofila fue más constante. González *et al.* (2007), trabajaron con *Agave fourcroydes* y reportan que a los 42 días que duró la aclimatación, las hojas ya eran consideradas funcionales, con estomas normales y ceras en su cubierta. Estos resultados coinciden con los encontrados en este estudio, ya que la aclimatación de *Agave americana* tuvo una duración de 49 días, por lo tanto, en los días posteriores, las plantas ya eran consideradas funcionales.

Todos los resultados indican que los tratamientos probados incrementaron la altura de la hoja mayor, el número de hojas, diámetro de corona y contenido de clorofila, no siendo el mismo tratamiento para cada una de ellas con mayor incremento. De acuerdo con los resultados de este estudio y a las consideraciones de otros autores, es evidente que las necesidades de las plantas son diferentes, dependiendo del ambiente en el cual se encuentran, por lo que un cambio de ambiente tendrá como consecuencia, adaptaciones en diferente escala dependiendo de la velocidad y la magnitud del cambio. Lo cual se observa con cualquier especie cuando se establece su cultivo *in vitro*, y al contrario cuando se debe aclimatizar nuevamente a las condiciones *ex vitro*, sin embargo los procesos evolutivos les dan esa capacidad,

agree with those found in this study, as *Agave americana* acclimation lasted 49 days, therefore, in the following days, the plants were already considered functional. All results indicate that the tested treatments increased the height of the largest leaf, leaf number, crown diameter and chlorophyll content, not being the same treatment for each increase more. According to the results of this study and consideration of other authors, it is clear that the plant needs are different, depending on the environment in which are located, so a change of environment will result, adaptations different scale depending on the speed and magnitude of change. Which is observed in any species when its cultivation *in vitro* is established, and unlike when to acclimatize again to *ex vitro* conditions, however evolutionary processes give them that ability through a "memory" long-term, the species preserves and allows you to develop best suited to survive according to the environment in which you find features, and this process can reverse it and adapt it as often as necessary.

In addition, the treatments were tested (Table 4) showed that in the last five weeks that were 210 to 245 days after transplantation to *ex vitro*, the treatment showed the largest increase taking into account all the variables was the combination of sand-vermiculita-peat with 50% fertilization.

Comparing both periods, it was noted that in the first five weeks established plants in sand substrate had higher increase irrigated with water unlike plants were irrigated with a dose; while in the last five weeks (between 210 and 245 days), plants that were established in the peat substrate irrigated with 50% mineral solution had a higher increase. This may be because the plants during the first few weeks did not require as supplemented irrigation and water only is more than enough to survive the average *ex vitro*, since at that time perform their duties at the expense of reserves acquired under *in vitro* conditions. It is important to note that once achieved adaptation and capacity to develop photosynthetic processes, exposure to greater light as in the nursery is favorable to increase growth rates and plant growth factor, therefore the stage after acclimatization plants and needed a further supplemented irrigation, because they no longer had reservations throughout the plant.

a través de una “memoria” a largo plazo, que la especie conserva y le permite desarrollar las características más adecuadas para sobrevivir de acuerdo con en el ambiente en el que se encuentre, y este proceso puede revertirlo y adecuarlo cuantas veces sea necesario.

Además, los tratamientos que se probaron (Cuadro 4) mostraron que en las últimas cinco semanas que fueron de 210 a 245 días después del trasplante a *ex vitro*, el tratamiento que mostró el mayor incremento tomando en cuenta todas las variables fue la combinación de arena-vermiculita-turba con 50% de dosis de fertilización.

**Cuadro 4. Medias de los incrementos por tratamiento de las últimas cinco semanas de aclimatación de *Agave americana* var. *Oaxacensis* L.**

**Table 4. Average of increments by treating the last five weeks of acclimatization of *Agave americana* var. *Oaxacensis* L.**

Sustrato	DF (%)	AHM (cm)	NH	DC (cm)	CL ( $\mu\text{g m}^{-2}$ )
Arena	0	1.3 ± 0.7 a	0.2 ± 0.4 b	1.0 ± 1.0b	1.2 ± 3.2 b
Arena/vermiculita	0	0.8 ± 0.7 a	0.0 ± 0.3 b	2.0 ± 5.7 b	1.0 ± 3.2 a
Arena/turba	0	0.9 ± 0.5 a	0.8 ± 0.9 a	9.1 ± 13.4 a	1.7 ± 5.2 b
Arena/vermiculita/turba	0	0.4 ± 0.7 b	0.5 ± 0.6 b	1.5 ± 0.5 b	1.8 ± 5.3 b
Arena	25	0.8 ± 0.6 a	0.4 ± 0.5 b	1.1 ± 0.4 b	1.1 ± 3.2 b
Arena/vermiculita	25	0.4 ± 0.5 b	0.7 ± 0.9 b	1.3 ± 0.4 b	1.0 ± 3.2 a
Arena/turba	25	1.4 ± 1.3 a	1.4 ± 0.5 a	1.9 ± 0.9 b	1.4 ± 4.8 b
Arena/vermiculita/turba	25	0.9 ± 0.9 a	0.5 ± 0.5 b	0.8 ± 0.3 b	2.2 ± 5.2 b
Arena	50	1.1 ± 1.0 a	0.5 ± 0.6 b	0.8 ± 0.2 b	0.5 ± 1.3 b
Arena/vermiculita	50	0.8 ± 1.1 a	0.6 ± 0.5 b	0.9 ± 0.3 b	3.7 ± 5.1 b
Arena/turba	50	0.5 ± 0.9 a	0.4 ± 0.5 b	1.0 ± 0.2 b	7.0 ± 8.2 b
Arena/vermiculita/turba	50	1.6 ± 1.2 a	0.8 ± 0.7 a	1.1 ± 0.3 b	10.9 ± 6.4 b
Arena	75	0.9 ± 0.7 a	1.1 ± 0.9 a	1.3 ± 0.4 b	7.5 ± 6.3 b
Arena/vermiculita	75	0.7 ± 0.5 a	2.4 ± 2.6 a	1.3 ± 0.3 b	6.5 ± 8.6 b
Arena/turba	75	1.7 ± 1.6 a	0.7 ± 0.4 b	1.5 ± 0.4 b	7.3 ± 5.5 b
Arena/vermiculita/turba	75	1.0 ± 0.4 a	1.1 ± 0.9 a	1.4 ± 0.4 b	6.4 ± 6.9 b
Arena	100	0.5 ± 0.4 b	1.0 ± 0.6 a	1.5 ± 0.6 b	6.9 ± 7.0 b
Arena/vermiculita	100	0.7 ± 0.6 a	2.2 ± 1.9 a	2.6 ± 2.0 b	7.9 ± 8.8 b
Arena/turba	100	2.1 ± 1.5 a	1.4 ± 2.0 a	1.4 ± 0.6 b	4.1 ± 6.5 b
Arena/vermiculita/turba	100	0.8 ± 0.8 a	0.3 ± 0.4 b	1.4 ± 0.6 b	11.1 ± 7.6 b

AHM= altura de la hoja mayor; NH= número de hojas; DC= diámetro de corona; CLOR= clorofila. La media se acompaña de la desviación estándar. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Comparando ambos períodos, se observó que en las primeras cinco semanas las plantas establecidas en el sustrato arena tuvieron mayor incremento irrigadas con agua a diferencia de las plantas que se irrigaron con alguna dosis; mientras que en las últimas cinco semanas (entre 210 y 245 días), las plantas que se establecieron en el sustrato turba irrigadas con 50% de solución mineral tuvieron mayor incremento. Esto puede

## Conclusions

The acclimatization stage can be concluded at seven weeks when *Agave americana* plants have stabilized their growth and development processes.

Micropropagated plants are replacing sheets between 35 and 70 days of acclimatization.

Established plants in sand-peat substrate showed higher growth increments without applying a dose of solution.

The presence of organic matter in the soil favors the acclimation process plant *Agave americana* var. *Oaxacensis* L.

*End of the English version*



deberse a que las plantas, durante las primeras semanas no necesitaron de un riego tan suplementado, y que con solo agua es más que suficiente para sobrevivir al medio *ex vitro*, ya que en ese lapso realizan sus funciones a expensas de las reservas adquiridas en condiciones *in vitro*. Es importante resaltar, que una vez lograda la adaptación y capacidad para desarrollar procesos fotosintéticos, la exposición a mayor luz como en el vivero es un factor favorable para incrementar las tasas de crecimiento y desarrollo de las plantas, por lo mismo la etapa después de la aclimatación las plantas ya necesitaron de un riego más suplementado, debido a que ya no tenían reservas en toda la planta.

## Conclusiones

La etapa de aclimatación se puede concluir a las siete semanas cuando las plantas de *Agave americana* han estabilizado sus procesos de crecimiento y desarrollo.

Las plantas micropropagadas presentan sustitución de hojas entre los 35 y 70 días de aclimatación.

Las plantas establecidas en el sustrato arena-turba mostraron mayores incrementos de crecimiento sin necesidad de aplicar alguna dosis de solución.

La presencia de materia orgánica en el sustrato favorece el proceso de aclimatización de plantas de *Agave americana* var. *Oaxacensis* L.

## Literatura citada

- Abreu, E. G.; González, R.; Ortiz, P.; Rodríguez, R.; Domech y M. Garriga. 2007. Evaluación de vitroplantas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem) durante la fase de aclimatización. Cuba. Cultivos Tropicales. 28: 5-11.
- Aureoles, F. J. L.; Rodríguez-de la O, J. P.; Legaria-Solano, J.; Sahagún-Castellanos, J.; Peña Ortega y M. Peña-Ortega. 2008. Propagación *in vitro* del "maguey bruto" (*Agave inaequidens* Koch.), una especie amenazada de interés económico. México. Rev. Chapingo. Ser. Hortic. 14: 263-269.
- Debergh, P. C. and Maene, L. J. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Sci. Hortic. 14:335-345.
- Domínguez, R. M. S.; González, M. L.; Rosales, C.; Quiñones, C.; Delgadillo, L.; Mireles, J. y Pérez, B. E. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. España. Investigación y Ciencia. 16:53-62.
- Enríquez, J. R.; Velásquez, B.; Vallejo, A. y Velasco, V. 2005. Nutrición de plantas de *Dendranthema grandiflora* obtenidas *in vitro* durante su aclimatación en invernadero. México. Rev. Fitotec. Mex. 28: 377-383.
- Enríquez, J. R. 2008. La propagación y crecimiento de agaves. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. México. 46 p.
- González, G.; Alemán, S.; Tujilo, R.; Kev, M.; Abreu, E.; Barredo, F.; Robert, M. L.; Ortiz, R. y Cordines, M. T. 2004. El cultivo *in vitro* como alternativa de la recuperación henequenera (*Agave fourcroydes*). Cuba. Biotecnología aplicada. 1:44-48.
- Iskander, C. R. 2002. Manejo de sustratos para la producción de plantas ornamentales en maceta. Department of Horticultural Sciences Texas University. USA. 9 p.
- Martínez, R. R.; Hazpiroz, H.; Rodríguez, J. L.; Cetina, V. M. y Gutiérrez, M. A. 2005. Aclimatación de plantas obtenidas *in vitro* *Eucalyptus urophylla* S. T. blake *Eucalyptus grandis* hill ex maiden. México. Revista Ra Ximhai. 3: 591-597.
- Morales C.; C. de la Fe, Corbera, J. y Calaña, J. M. 2009. Estudio de la aclimatización de vitroplantas de anturio (*Anthurium andreaeanum* Lin.). Cuba. Cultivos Tropicales. 30: 48-51.
- Monja-Mio M. K.; Barredo, P. F.; Herrera, H.; Esqueda, V. M. and Robert, L. M. 2015. Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora' plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process. Sci. Hortic. 189:32-40.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. Plant Physiol. 25:135-166.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plantarum. 15: 473-497.
- Murguía, G. J. 1993. El cultivo de los anturios (*Anthurium andreaeanum* L.) Córdoba: Facultad de Ciencias Agrícolas Universidad Veracruzana. Veracruz. 28 p.
- Obledo V. E. N.; Flores, V. N. y Cervantes, M. J. 2004. Detección del efecto de un extracto vegetal antimicrobiano sobre plantas de agave (*Agave tequilana* wevervar. azul) cultivadas *in vitro* utilizando fluorescencia inducida por laser (LIF). Rev. Mex. Fitopatol. 22:328-332.
- Olmos, S.; Luciani, G. y Galdeano, E. 2004. Métodos de propagación y conservación de germoplasma; biotecnología y mejoramiento vegetal. Argen Bio. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. 161-172 pp.
- Ortiz, R. 2000. Factores que afectan el desarrollo de vitroplantas de caña de azúcar en la fase adaptativa. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 36 p.
- Pospisilová, J. I.; Tichá, P.; Kadlecěk, D. and Plzáková, Y. S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. Biol. Plantarum. 42: 481-497.
- Preece, J. E. and Sutter, E. G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field. In: Debergh, P. C. and Zimmerman, R. H. (Eds.). Micropropagation: technology and application. Kluwer Academic. Dordrecht. 71-93 pp.
- Salazar, E.; González, P. y Hernández, C. 2009. Multiplicación *in vitro* de *Agave cocui* Trelease a través de yemas axilares. Agron. Trop. 59:129-135.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. International Society For Soilless Culture (ISOSC). In: Sixth International Congress on Soilless Culture Lunteren. pp: 633-650.
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2002. Fisiología vegetal. Universidad Jaume. 3ª edición. 581 p.
- Urresatarazu, M. G. 2000. Manual de cultivo sin suelo. Editorial Mundi-prensa. Madrid, España. 465 p.