

## Fertirriego en vivero a plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas-aclimatizadas\*

### Fertigation in nursery plants of *Agave potatorum* Zucc micropropagated acclimatized

José Raymundo Enríquez del Valle<sup>1§</sup>, Sergio Enrique Alcara Vázquez<sup>1</sup>, Gerardo Rodríguez Ortiz<sup>1</sup>, Maura Elisama Miguel Luna<sup>1</sup> y Calep Manuel Vázquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Ex-Hacienda de Nazareno Xoxocotlán, Oaxaca, México. C. P. 71230. Tel: (01951) 5170788, 5170444. (alcara19@gmail.com; lunitastar.mar@hotmail.com; ing.calep.mv@gmail.com). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: jenriquezdelvalle@yahoo.com.

#### Resumen

El *Agave potatorum* Zucc, es una especie silvestre recolectada en campo para elaborar una bebida destilada denominada mezcal, y no se tiene suficiente información acerca de su manejo agronómico y necesidades nutrimentales. El objetivo de la investigación fue evaluar durante cinco meses en vivero el desarrollo de plantas micropropagadas-aclimatizadas de *Agave potatorum* Zucc las que se fertirrigaron con cantidades diferentes de nutrimentos. En el periodo 2013-2014, un total de 210 plantas micropropagadas se establecieron individualmente en macetas de 300 cm<sup>3</sup> con sustrato que fue una mezcla 1:1 en volumen de perlita y turba, se aclimatizaron durante 60 días en invernadero y 60 días en vivero. Las plantas aclimatizadas, homogéneas en tamaño, se separaron en seis grupos de 35 plantas, para aplicar a cada grupo fertirriego con una concentración diferente (1, 20, 40, 60, 80 y 100%) de nutrimentos, de la solución universal de Steiner. Diariamente durante los días 121 a 270 se fertirrigaba cada planta con 10 mililitros a nivel de sustrato. Al término del periodo, los datos mostraron que las plantas alcanzaron mayor tamaño conforme se fertirrigaron con dosis crecientes de nutrimentos, de tal manera que las plantas fertirrigadas con 1 y 100% tuvieron 9.8 y 17 hojas, 126.53 y 392.35 cm<sup>2</sup> de área foliar, 2.22 y 2.84 cm de diámetro del tallo, 10.5 y 17.4 raíces primarias, 4 y 7.4 cm<sup>3</sup> de volumen de raíz, 2.79 y 6.50 g de peso seco foliar, respectivamente.

#### Abstract

The *Agave potatorum* Zucc, is a wild species collected in the field to produce a distilled beverage called mezcal, and not enough is known about their agronomic management and nutritional needs. The aim of the research was to evaluate breeding ground for five months in the development of micropropagated-acclimatized plants *Agave potatorum* Zucc which fertirrigaron with different amounts of nutrients. In the period 2013-2014, a total of 210 micro-propagated plants were established individually in pots of 300 cm<sup>3</sup> with substrate was a 1:1 by volume perlite and peat were acclimatized for 60 days and 60 days greenhouse nursery. The acclimatized plants, uniform in size, split into six groups of 35 plants, to apply to each fertigation group with a different concentration (1, 20, 40, 60, 80 and 100%) of nutrients, universal solution Steiner. Daily on days 121-270 each plant is fertigate with 10 milliliters substrate level. At the end of the period, the data showed that the plants reached larger as they fertigation with increasing doses of nutrients, so plants fertigation 1 and 100% were 9.8 and 17 leaves, 126.53 and 392.35 cm<sup>2</sup> of leaf area, 2.22 and 2.84 cm stem diameter, 10.5 and 17.4 taproots, 4 and 7.4 cm<sup>3</sup> volume root, 2.79 and 6.50 g of leaf, dry weight, respectively.

**Keywords:** micropropagation plant nutrition, nutrient solution, peat, perlite.

\* Recibido: abril de 2016  
Aceptado: julio de 2016

**Palabras clave:** micropropagación, nutrición vegetal, perlita, solución nutritiva, turba.

## Introducción

Los pueblos indígenas y mestizos americanos han aprovechado varias especies de agave desde hace siete mil años. Los agaves son especies monocotiledoneas de los que obtienen diversos bienes y servicios, tales como sustancias para uso medicinal, combustible, cobijo, ornato, abono, materiales para la construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas (García-Mendoza, 2007). El *Agave potatorum* Zucc es una especie silvestre propia de selva baja caducifolia, que es aprovechada de manera no planificada, por lo que sus poblaciones han sido disminuidas en los Valles centrales, sierra sur y Mixteca del estado de Oaxaca. Se le usa principalmente para la elaboración artesanal de una bebida alcohólica destilada denominada mezcal (Pérez y Casas, 2007), con un sabor y aroma característicos debido a la proporción de compuestos aromáticos volátiles (Molina *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2009; Vera-Guzmán *et al.*, 2010).

De tres a cinco meses antes de que las plantas adultas se colecten, los campesinos evitan que desarrollen el tallo floral y por consiguiente se evita la producción de semillas, vitales para su propagación, de tal manera que las poblaciones de esta especie han disminuido notablemente (Enríquez, 2008). Se tienen antecedentes no documentados que desde fines de los años 1990's grupos de campesinos de la sierra sur de Oaxaca han implementado su propagación mediante semilla y establecen plantaciones. Sin embargo, la cantidad de plantas que se producen aun no compensa la cantidad de plantas adultas que se cosechan, por lo que se propone la propagación *in vitro* como complemento a los métodos convencionales.

La micropropagación, consiste en la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de células, tejidos u órganos vegetales, con la cual se pueden obtener producciones masivas en poco tiempo y que ayudaría a aumentar en un mediano plazo la disponibilidad de materia prima de esta especie. Para incrementar la producción de plantas de esta especie, se necesita generar protocolos en que se definan las condiciones de cultivo en cada etapa: selección de plantas a propagar, propagación *in vitro*, aclimatización en invernadero, crecimiento en vivero, cultivo en campo.

## Introduction

The indigenous peoples and natives americans have used several species of agave for seven thousand years ago. Agaves are monocots of those who obtain various goods and services, such as substances for medicinal use, fuel, shelter, ornamental, fertilizer, materials for housing construction and development of agricultural implements (García-Mendoza, 2007) species. The *Agave potatorum* Zucc is a very wild species of deciduous forest which is exploited in unplanned manner, so that their populations have been reduced in the central valleys, Mixteca highlands and southern state of Oaxaca. It is used mainly for the craftsmanship of an alcoholic drink distilled called mezcal (Pérez and Casas, 2007), with a flavor and aroma due to the proportion of volatile aromatic compounds (Molina *et al.*, 2007; Vera *et al.*, 2009; Vera-Guzmán *et al.*, 2010).

Three to five months before mature plants from collecting, farmers prevent develop the floral stem and therefore seed production, vital for propagation, so prevents the populations of this species have declined dramatically (Enríquez, 2008). The history not documented since the late 1990 's groups of farmers in the southern highlands of Oaxaca have implemented their propagation by seed and have established plantations. However, the number of plants produced even not compensate the amount of adult plants harvested, so propagation *in vitro* as complementary to conventional methods.

The micropropagation, is the asexual propagation of plants using the techniques of cell culture, tissue or plant organs, with which you can get mass production in a short time and would help to increase in the medium term availability of raw material of this species. To increase the production of plants of this species, protocols need to be generated when the growing conditions are defined at each stage: selection of plants to propagate, *in vitro* propagation, acclimatization in the greenhouse, growth in nursery, field crop.

In a process of micropropagation the risk of death of plants produced *in vitro* occurs it is when they are transferred to the ground and must adapt to new environmental conditions *ex vitro* (Dominguez and Donayre, 2006). This can be overcome by subjecting plants to a process of acclimatization in greenhouse and nursery during which micropropagated plants develop resistant structures to environmental

En un proceso de micropropagación se presenta el riesgo de que ocurra la muerte de plantas producidas *in vitro* cuando éstas se transfieren al suelo y deben adaptarse a las nuevas condiciones del ambiente *ex vitro* (Domínguez y Donayre, 2006). Lo anterior se puede superar al someter las plantas a un proceso de aclimatización en invernadero y vivero durante el cual las plantas micropropagadas desarrollan estructuras resistentes a las condiciones ambientales *ex vitro*, en que se presentan condiciones de baja humedad relativa, alta intensidad de luz, fluctuaciones de temperatura y constante estrés de resistencia a enfermedades.

La aclimatización satisfactoria, aumenta la tasa de sobrevivencia de las plantas cuando éstas se establecen en vivero y campo. Se tienen antecedentes de micropropagar y la aclimatización de diversas especies de agaves: *A. tequilana* (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006); *A. cocui* (Salazar *et al.*, 2009); *A. fourcroydes* (Garriga *et al.*, 2010); *A. americana* (Enríquez *et al.*, 2013). En la aclimatización en invernadero de plantas micropropagadas de *A. angustifolia* Enríquez *et al.* (2012) mostraron que el nivel de abastecimiento de nutrimentos tuvo efecto positivo en el tamaño que estas plantas alcanzaron al término de 70 días de esta etapa.

Diversos factores ambientales afectan la productividad de las plantas: temperatura, disponibilidad de agua, CO<sub>2</sub>, radiación solar, abastecimiento de nutrimentos. Para el buen desarrollo de las plantas es necesario el aporte de nutrimentos, tales como el nitrógeno, fósforo, potasio, azufre, calcio y magnesio y los micronutrimentos hierro, cobre, manganeso, zinc, molibdeno, cloro, boro y níquel. Cuando un suelo no proporciona alguno de estos nutrimentos en la cantidad suficiente que la requerida por las plantas, es necesario aplicarlo a través de un fertilizante que contenga dicho nutrimento. Dentro de los nutrimentos esenciales, el nitrógeno es el más importante, pues aunque la planta cuente con un abastecimiento adecuado del resto de los elementos minerales, su disponibilidad en cantidades inferiores al óptimo se manifiesta con un crecimiento, desarrollo y producción deficientes (Martínez *et al.*, 2013). En plantas de *Agave potatorum* en campo, su abastecimiento influyó en el tamaño del área foliar, concentración de clorofila, la fotosíntesis neta lo que influye en la productividad (Moya, 2002; Martínez-Ramírez *et al.*, 2012).

Debido a los pocos estudios de producción *in vitro* de *Agave potatorum* Zucc, es necesario investigar por medio de la experimentación, los medios adecuados para su propagación, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el desarrollo en vivero de plantas de *Agave*

conditions *ex vitro*, in which conditions of low relative humidity are present, high light intensity fluctuations temperature constant stress and disease resistance.

The successful acclimatization increases the survival rate of the plants when they are set in nursery and field. The history of micropropagation and acclimatization of various species of agaves are taken: *A. tequilana* (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006); *A. cocui* (Salazar *et al.*, 2009); *A. fourcroydes* (Garriga *et al.*, 2010); *A. americana* (Enríquez *et al.*, 2013). In the acclimatization of micropropagated greenhouse plants *A. angustifolia* Enríquez *et al.* (2012) showed that the level of nutrient supply had a positive effect on the size that these plants have reached the end of 70 days of this stage.

Several environmental factors affect the productivity of plants: temperature, water availability, CO<sub>2</sub>, solar radiation, nutrient supply. For the proper development of plants needed the contribution of nutrients, such as nitrogen, phosphorus, potassium, sulfur, calcium and magnesium and iron micronutrients, copper, manganese, zinc, molybdenum, chlorine, boron and nickel. When a floor does not provide any of these nutrients in sufficient quantity than required by the plants, it is necessary to apply through a fertilizer containing that nutrient. Among the essential nutrients, nitrogen is the most important, because although the plant has adequate supplies of other minerals, its availability in less than optimal amounts manifests with growth, development and deficient production (Martínez *et al.*, 2013). The plants *Agave potatorum* field, its supply influenced the size of leaf area, chlorophyll concentration, net photosynthesis which affects productivity (Moya, 2002; Martínez-Ramírez *et al.*, 2012).

Because of the few studies of *in vitro* production of *Agave potatorum* Zucc, you need to research through experimentation, suitable means for propagation, so the objective of this study was to evaluate the development nursery plants *Agave potatorum* micropropagated-acclimatized, which fertigation for five months with different doses of nutrients.

## Materials and methods

This research was conducted in the laboratory of plant tissue culture, greenhouse acclimatization and in the nursery of Technological Institute of Oaxaca Valley, in the town of Nazareth, the municipality of Santa Cruz Xoxocotlan, to 12

*potatorum* micropropagadas-aclimatizadas, las que se fertilizaron durante cinco meses con dosis diferentes de nutrimentos.

## Materiales y métodos

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, invernadero de aclimatación y en el vivero del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, en la población de Nazareno, municipio de Santa Cruz Xoxocotlán, a 12 km de la ciudad de Oaxaca. Se ubica en las coordenadas 96° 44' longitud oeste, 17° 02' latitud norte y a una altura de 1 530 msnm (INEGI, 2010).

Se obtuvieron *in vitro* 300 plantas de *Agave potatorum* Zucc a partir de la proliferación de brotes adventicios y el posterior enraizado de éstos. Las plantas, homogéneas en características, se retiraron de la condición *in vitro*, enjuagaron cuidadosamente para retirar el agar impregnado en las raíces y se transfirieron individualmente a macetas de 300 cm<sup>3</sup>, con un sustrato que fue una mezcla 1:1 en volumen de perlita y turba; y se colocaron en condiciones de invernadero de aclimatación.

Las plantas para su aclimatación estuvieron 60 días en el invernadero con alta humedad relativa (80- 90%) creada por un sistema de riego por nebulización intermitente que funcionaba 10 s cada 12 min de las 10:00 a las 15:00 h; radiación solar difusa a 500-700  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La frecuencia de los riegos se controló mediante temporizadores. Posterior al periodo de nebulización las plantas se fertilizaban a nivel de sustrato con la solución universal de Steiner (1984) a 50% de concentración de nutrimentos. A partir del día 61 y hasta el día 120, las plantas estuvieron en vivero, con piso de concreto, expuestas a radiación solar disminuida 40% con malla sombra. En el vivero las plantas ya no recibieron riegos por nebulización, pero sí fertilizaban a nivel de sustrato. Transcurridos los 120 días se seleccionaron 210 plantas homogéneas en tamaño y se separaron en seis grupos de 35 plantas cada uno, para que cada grupo recibiera durante los días 121 a 270, fertilizaban con una concentración diferente de nutrimentos, de 10 mL por maceta con alguna alícuota (1, 20, 40, 60, 80 y 100%) de la solución universal de Steiner (1984). El fertilizaban se aplicó durante 150 días, desde el día 121 al día 270. La formulación de Steiner a 100% contiene en  $\text{mg L}^{-1}$ : 166.01 N, 31.35 P, 277.38 K, 182.06 Ca, 49.08 Mg, 110.898 S; 1.33 Fe, 0.00065 Cu, 0.201 Mn, 0.0375 Zn, 0.077 B, 0.019 Mo.

km from the city of Oaxaca. It is located at coordinates 96° 44' west longitude, 17° 02' north latitude and altitude of 1 530 msnm (INEGI, 2010).

The 300 plants *Agave potatorum* Zucc were obtained *in vitro* from the proliferation of adventitious shoots and rooted back thereof. Plants, homogeneous characteristics, withdrew from the *in vitro* condition, rinsed thoroughly to remove the impregnated agar on the roots and individually transferred to pots of 300 cm<sup>3</sup>, with a substrate was a 1:1 by volume perlite and peat; and they placed under greenhouse conditions acclimatization.

The plants for acclimatization were 60 days in the greenhouse with high relative humidity (80- 90%) created by an irrigation system running intermittent mist 10 s every 12 min from 10:00 to 15:00 h; diffuse solar radiation 500-700  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . The frequency of watering is controlled by timers. After the period misting plants fertigation level substrate with the universal solution Steiner (1984) to 50% concentration of nutrients. From day 61 until day 120, they were in nursery plants, with concrete floor, exposed to solar radiation decreased 40% mesh shade. In the nursery plants no longer received nebulized risks, but if fertigation level substrate. After 120 days 210 homogeneous plants were selected in size and separated into six groups of 35 floors each, so that each group received during the days 121-270, fertigation with a different concentration of nutrients, 10 mL per pot with some aliquot (1, 20, 40, 60, 80 and 100%) of the universal solution Steiner (1984). Fertigation was applied for 150 days, from day 121 to day 270. The formulation contains 100% Steiner in  $\text{mg L}^{-1}$ : 166.01 N, 31.35 P, 277.38 K, 182.06 Ca, 49.08 Mg, 110.898 S; 1.33 Fe, 0.00065 Cu, 0.201 Mn, 0.0375 Zn, 0.077 B, 0.019 Mo.

On day 270 were randomly ten plants per treatment, in which the number of sheets was counted; leaf area (cm<sup>2</sup>) was measured by placing the blade assembly in an acetate, of which a copy was obtained; images of the leaves were cut and weighed on an analytical balance with capacity of 160 g and 0.1 mg accuracy and this weight was compared with the corresponding piece of paper of the same quality and known area. The stem diameter (cm) was measured by a vernier; number of primary roots; for the root volume (cm<sup>3</sup>) it was separated from the rest of the plant, immersed in a known volume of water in a 250 ml graduated cylinder, determining the volume by water displacement. To determine in each plant its leaf dry weight (g), stem dry weight (g) and dry root weight (g) these were placed separately in paper bags,



En el día 270 se tomaron al azar diez plantas por tratamiento, en las cuales se contabilizó su número de hojas; el área foliar ( $\text{cm}^2$ ) se cuantificó al colocar el conjunto de hojas en un acetato, del que se obtuvo una fotocopia; las imágenes de las hojas se recortaron y pesaron en una balanza analítica con capacidad de 160 g y precisión de 0.1 mg y este peso se comparó con el correspondiente de un trozo de papel de la misma calidad y de área conocida. El diámetro del tallo (cm) se determinó mediante un vernier; número de raíces primarias; para el volumen de raíz ( $\text{cm}^3$ ) ésta se separó del resto de la planta, se sumergió en un volumen conocido de agua en una probeta graduada de 250 ml, determinando el volumen mediante el desplazamiento del agua. Para determinar en cada planta su peso seco foliar (g), peso seco del tallo (g), y peso seco de las raíces (g) estas se pusieron por separado en bolsas de papel, las que se colocaron durante 72 h en estufa de secado a  $70^\circ\text{C}$  para después pesar cada uno en balanza analítica con capacidad de 160 g y precisión de 0.1 mg.

El experimento se estableció según un diseño completamente al azar. La unidad experimental fue una planta en una maceta de  $300\text{ cm}^3$  y se tuvieron 10 repeticiones por tratamiento. Los datos se sometieron al análisis de varianza, la prueba de Tukey para comparación de medias ( $\alpha=0.05$ ) y además se realizaron análisis de correlación.

## Resultados y discusión

Al aplicar un protocolo de micropropagación vegetal, interesa obtener gran cantidad de plantas de morfología normal y que gran proporción de éstas se adapte con éxito a condiciones de invernadero, vivero y campo. Se tienen antecedentes de la micropropagación de *A. potatorum* (Domínguez *et al.*, 2008) en que la proliferación de brotes se logró en un medio de cultivo con citocininas, e incubados por 30 a 45 días bajo luz continua a  $54\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ . Los brotes obtenidos se transfirieron para su enraizado a medio de cultivo sin citocininas, en condiciones similares de incubación que la etapa anterior y transcurridos 30 días; 87% de los brotes había formado raíces adventicias. Las plantas se transfirieron a macetas y condiciones de invernadero, y transcurridos 45 días el 73% de estas plantas se había adaptado. En dicho trabajo se consideró que la adaptación de las plantas había sido exitosa cuando éstas mostraron reinicio de crecimiento. No se tienen antecedentes del desempeño en vivero de las plantas de *Agave potatorum* micropropagadas-aclimatizadas. Abreu *et al.* (2007) describieron que plantas

which were placed for 72 h in oven dried at  $70^\circ\text{C}$  for after each weigh on analytical balance with capacity of 160 g and 0.1 mg accuracy.

The experiment was established as a completely randomized design. The experimental unit was a plant in a pot of  $300\text{ cm}^3$  and 10 repetitions per treatment. Data were subjected to analysis of variance, Tukey test for comparison of means ( $\alpha=0.05$ ) and also correlation analysis were performed.

## Results and discussion

By applying a plant micropropagation protocol, interested get lots of plants and normal morphology large proportion of them successfully adapt to greenhouse conditions, nursery and field. Background micropropagation of *A. potatorum* (Domínguez *et al.*, 2008) that the proliferation of outbreaks was achieved in a culture medium with cytokinins have, and incubated for 30 to 45 days under continuous light at  $54\ \text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ . The shoots obtained were transferred to a rooting medium without cytokinins, under similar incubation conditions as above the stage and after 30 days; 87% of the outbreaks had formed adventitious roots. The plants were transferred to pots and greenhouse conditions, and after 45 days 73% of these plants had adapted. In this work it was considered that the adaptation of plants had been successful when they showed resumption of growth. Do not have a history of performance in nursery plants *Agave potatorum* micropropagated-acclimatized. Abreu *et al.* (2007) reported that micro-propagated plants of *A. fourcroydes* when 45-60 days had elapsed greenhouse acclimation lost their older leaf formed during culture in vitro, as these leaves were not able to take the anatomical changes needed for adaptation.

In this paper, by subjecting micropropagated-acclimatized plants *Agave potatorum* to fertigation during the days 121 to 270, analyzes of variance (Table 1) showed that fertilization (1, 20, 40, 60, 80 and 100 %) had highly significant different effect ( $P\leq 0.01$ ) on the development of plants in the number of sheets (NH), dry weight of leaves (PSH), leaf area (AF), stem diameter (DT), weight dry stem (PST), number of primary roots (NRP), root volume (VR) and the dry weight of the roots (PSR).

The plants *Agave potatorum* Zucc, who underwent the nutrient solution with 100% concentration and plants were subjected to the nutrient solution 1% (Table 2) showed

micropropagadas de *A. fourcroydes* cuando habían transcurrido 45- 60 días de aclimatización en invernadero perdieron su hoja de mayor edad, formada durante el cultivo *in vitro*, pues estas hojas no fueron capaces de asumir los cambios anatómicos necesarios para la adaptación.

En el presente trabajo, al someter las plantas micropropagadas-aclimatizadas de *Agave potatorum* a fertirriego durante los días 121 al 270, los análisis de varianza (Cuadro 1) mostraron que las dosis de fertilización (1, 20, 40, 60, 80 y 100%) tuvieron efecto diferente altamente significativo ( $Pr \leq 0.01$ ) sobre el desarrollo de las plantas en su número de hojas (NH), peso seco de las hojas (PSH), área foliar (AF), diámetro del tallo (DT), peso seco del tallo (PST), número de raíces primarias (NRP), volumen de raíz (VR) y en el peso seco de las raíces (PSR).

6.5 and 2.79 g of leaf dry weight, 392.35 and 126.53 cm<sup>2</sup> leaf area, 2.84 and 2.22 cm diameter of the stem; 7.4 and 4.0 cm<sup>3</sup> volume root, 0.92 and 0.6 g dry weight of roots, magnitudes that in each case were significantly different (Tukey, 0.05). In the correlation analysis variable number of leaves it had highly significant positive correlation ( $Pr \leq 0.01$ ) with the dry weight of the leaves ( $r = 0.76$ ), leaf area ( $r = 0.88$ ), stem diameter ( $r = 0.63$ ), foliar volume ( $r = 0.84$ ) and dry weight of roots ( $r = 0.48$ ). Teixeira *et al.* (2005), mentioned in the acclimatization plants micropropagated banana, include high humidity, a temperature ranging from 18 to 28 °C, solar radiation decreased by 50% by using shadows, the substrate with sufficient porosity to adequately root aeration and drainage of excess water. Furthermore, nutrient supply has an effect on the size of the plant because

**Cuadro 1. Resumen de análisis de varianza de las características de las plantas de *Agave potatorum* Zucc, obtenidas *in vitro* que durante cinco meses en vivero de aclimatización recibieron soluciones nutritivas con concentraciones diferentes de nutrimentos.**

**Table 1. Summary analysis of variance of the characteristics of plants *Agave potatorum* Zucc, obtained *in vitro* for five months in acclimatization nursery received nutrient solutions with different concentrations of nutrients.**

FV	GL	Cuadrados medios y significancia			
		NH	PSH	AF	DT
Trat	5	65.42 **	19.65 **	102583.91 **	0.792 **
Error	54	2.59	0.82	1827.08	0.071
Total	59				
fv	GL	PST	NRP	VR	PSR
Trat	5	0.0537 **	65.50 **	19.14 **	0.192 **
Error	54	0.0073	6.79	4.21	0.05
Total	59				

FV= fuente de variación; TRAT= tratamiento; GL= grados de libertad; NH= número de hojas; PSH= peso seco de las hojas (g); AF= área foliar (cm<sup>2</sup>); DT= diámetro del tallo (cm); PST= peso seco del tallo (g); NRP= número de raíces primarias; VR= volumen de raíz (cm<sup>3</sup>); PSR= peso seco de las raíces (g); \*\*altamente significativo con  $Pr \leq 0.01$ ; \*significativo con  $Pr \leq 0.05$ ; ns= no significativo.

Las plantas de *Agave potatorum* Zucc, que se sometieron a la solución nutritiva con concentración al 100% y las plantas que se sometieron a la solución nutritiva al 1% (Cuadro 2) presentaron 6.5 y 2.79 g de peso seco foliar, 392.35 y 126.53 cm<sup>2</sup> de área foliar, 2.84 y 2.22 cm de diámetro del tallo; 7.4 y 4.0 cm<sup>3</sup> de volumen de raíz, 0.92 y 0.6 g de peso seco de raíces, magnitudes que en cada caso fueron significativamente diferentes (Tukey, 0.05). En el análisis de correlación la variable número de hojas tuvo correlación positiva, altamente significativa ( $Pr \leq 0.01$ ) con el peso seco de las hojas ( $r = 0.76$ ), área foliar ( $r = 0.88$ ), diámetro del tallo ( $r = 0.63$ ), volumen foliar ( $r = 0.84$ ) y con el peso seco de raíces ( $r = 0.48$ ). Teixeira

Enríquez *et al.* (2009) reported that plants *Agave angustifolia* Haw. micropropagated-acclimatized for 70 days in a greenhouse in containers with perlite substrate and subsequently with mixtures of sand-compost nursery. It was found that plants receiving nutrient solution had higher growth than fertigation not, even though both types of plants had been in substrates high in organic matter.

As the amount of nutrients increased Steiner nutrient solution plants *Agave potatorum* Zucc. micropropagated-acclimatized, reaching larger sizes, so that larger plants were as fertigation with the nutrient solution 100%. After

*et al.* (2005), menciona en la aclimatización de plantas de banano micropropagadas, debe incluir alta humedad relativa, una temperatura que va desde 18 a 28 °C, radiación solar disminuida en 50% mediante el uso de sombras, el sustrato con suficiente porosidad para adecuada aireación de las raíces y drenaje de exceso de agua. Además, el suministro de nutrientes tiene efecto sobre el tamaño de la planta, ya que Enríquez *et al.* (2009) describieron que plantas de *Agave angustifolia* Haw. micropropagadas-aclimatizadas durante 70 días en invernadero en contenedores con sustrato perlita y posteriormente con mezclas de arena-compost en vivero. Se encontró, que las plantas que recibieron solución nutritiva tuvieron crecimiento superior que las no fertirrigadas, aun cuando ambos tipos de plantas hubieran estado en sustratos con contenido alto de materia orgánica.

five months of the plants were fertigation with different concentrations of nutrients, it was observed that all plants subject to supply various nutritional levels increased in the number of sheets (Figure 1), but the increase was in positive relationship with fertigation doses they received. Plants that fertigation with the nutrient solution to 100% concentration of nutrients developed on average 9.75 sheets, significantly amount (Tukey, 0.05) higher than 2.55, 5.35, 6.65, 7.45 and 8.65 sheets that had plants were fertigation to 1, 20, 40, 60 and 80% concentration of nutrients. Correlation analysis showed that doses of fertigation had a highly significant positive correlation ( $r=0.82$ ;  $Pr\leq 0.01$ ) with the number of sheets that formed the plants. Medrano *et al.* (2010), micropropagated *Agave durangensis* and assessed acclimation of several groups of plants to set them on various substrates that consisted of

**Cuadro 2. Características de las plantas micropropagadas-aclimatizadas de *Agave potatorum* Zucc después de cinco meses en vivero aplicándoles diferentes concentraciones de la solución Steiner.**

**Table 2. Characteristics of micropropagated-acclimatized plants *Agave potatorum* Zucc, after five months in the nursery by applying different concentrations of the Steiner solution.**

Trat	Con	Promedios									
		PSH		AF		DT		VR		PSR	
1	1%	2.79	C	126.53	D	2.22	C	4	B	0.6	B
2	20%	3.64	C	205.53	C	2.47	BC	6.4	AB	0.85	AB
3	40%	5.07	B	265.41	B	2.71	AB	7.5	A	0.97	A
4	60%	5.13	B	313.16	B	2.89	A	7.6	A	0.94	A
5	80%	5.98	AB	370.91	A	2.94	A	7.2	A	0.93	A
6	100%	6.5	A	392.35	A	2.84	A	7.4	A	0.92	A

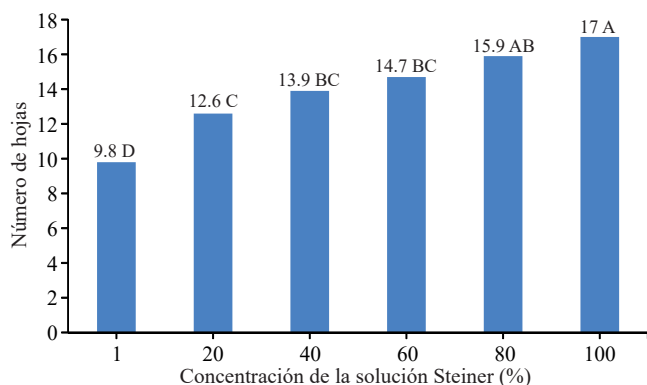
Trat= tratamiento; CON= concentración; PSH= peso seco de las hojas (g); AF= área foliar (cm<sup>2</sup>); DT= diámetro del tallo (cm); VR= volumen de raíz (cm<sup>3</sup>); PSR= peso seco de las raíces (g). En cada columna valores con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

Conforme se incrementó la cantidad de nutrimentos en la solución nutritiva Steiner las plantas de *Agave potatorum* Zucc. micropropagadas-aclimatizadas, alcanzaron tamaños mayores, de tal manera que las plantas más grandes fueron las que se fertirrigaron con la solución nutritiva al 100%. Transcurridos cinco meses, de que las plantas se estuvieron fertirrigando con concentraciones diferentes de nutrimentos, se observó que todas las plantas sometidas al abastecimiento de diversos niveles nutrimentales incrementaron en el número de hojas (Figura 1), pero el incremento estuvo en relación positiva con las dosis de fertirriego que recibieron. Las plantas que se fertirrigaron con la solución nutritiva a 100% de concentración de nutrimentos desarrollaron en promedio 9.75 hojas, cantidad significativamente (Tukey, 0.05) superior a las 2.55, 5.35, 6.65, 7.45 y 8.65 hojas que tuvieron las plantas que fueron fertirrigadas a 1, 20, 40, 60 y 80% de concentración de nutrimentos. El análisis de correlación mostró que las dosis

soil mixtures, volcanic gravel, and sheep manure. After the acclimatization plants grown in substrate with gravel and organic matter, they achieved larger plants established in only gravel substrate, which does not provide nutrients. Uvalle and Velez (2007) nutrition experiment of *Agave tequilana* Wever var. Blue mention that the plants that are supplied with nutrients through fertilization, increased photosynthetic capacity for CO<sub>2</sub> fixation and biomass accumulation. The micropropagated plants *Agave cocui* the effect of ammonium nitrate was evaluated in three treatments (0, 0.5 and 1 g L<sup>-1</sup> respectively), and determined that the plants fertilized with 0.5 g L<sup>-1</sup> formed more leaves that unfertilized plants (Díaz *et al.*, 2011).

The plants accumulated more dry matter as were increased supply of nutrients, such that the fertigation plants with concentrations of 1, 20, 40, 60, 80 and 100% nutrients, their stems were 0.18, 0.25, 0.33, 0.32, 0.37 and 0.37 g of

de fertirriego tuvieron una correlación positiva altamente significativo ( $r=0.82$ ;  $P_r \leq 0.01$ ) con la cantidad de hojas que formaron las plantas. Medrano *et al.* (2010), micropropagaron *Agave durangensis* y evaluaron la aclimatización de varios grupos de plantas al establecerlos en diversos sustratos que consistieron de mezclas de tierra, grava volcánica, y abono ovino. Al término de la aclimatización plantas que crecieron en el sustrato con grava y materia orgánica, alcanzaron mayor tamaño que las plantas establecidas en sustrato de solo grava, que no aporta nutrimentos. Uvalle y Vélez (2007) en experimento de nutrición de *Agave tequilana* Wever var. Azul mencionan que las plantas a las que se abasteció con nutrimentos mediante fertilización, aumentaron su capacidad fotosintética para la fijación de  $CO_2$  y la acumulación de biomasa. En plantas micropropagadas de *Agave cocui* se evaluó el efecto del nitrato de amonio en tres tratamientos (0, 0.5 y  $1 \text{ g L}^{-1}$  respectivamente), y se determinó que las plantas fertilizadas con  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  formaron mayor cantidad de hojas que las plantas no fertilizadas (Díaz *et al.*, 2011).

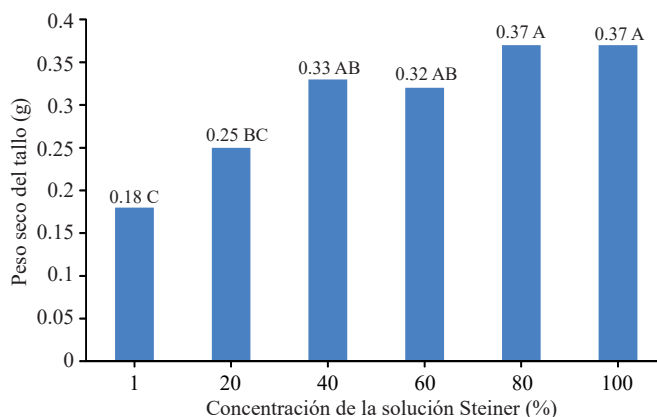


**Figura 1.** Cantidad de hojas que tuvieron las plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas-aclimatizadas, después de cinco meses en vivero, durante las cuales recibieron diferentes concentraciones de la solución nutritiva de Steiner. En la gráfica, valores con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

**Figure 1.** Number of sheets that had plants *Agave potatorum* Zucc, micropropagated-acclimatized, after five months in the nursery, during which received different concentrations of the nutrient solution Steiner. In the graph, values with the same letter are not significantly different (Tukey, 0.05).

Las plantas acumularon más materia seca conforme se les incrementó el abastecimiento de nutrimentos, de tal manera que las plantas fertirrigadas con concentraciones de 1, 20, 40, 60, 80 y 100% de nutrimentos, sus tallos tuvieron 0.18, 0.25, 0.33, 0.32, 0.37 y 0.37 g de materia seca (Figura 2), y su biomasa total fue de 3.57, 4.74, 6.37, 6.39, 7.28 y 7.79 g, respectivamente. Entre el 76.8 y 83.4% de la biomasa total

dry matter (Figure 2), and total biomass was 3.57, 4.74, 6.37, 6.39, 7.28 and 7.79 g, respectively. Between 76.8 and 83.4% of the total biomass concentrated in the leaves, between 4.7 and 5.2% concentrated in the stem and between 11.8 and 17.9% concentrated in the root. The plants that fertigation 100% concentration of nutrients had 2.05 times the amount of dry matter in the stem compared to plants fertigation 1% concentration of nutrients. Plants subjected to the treatment of 100% nutrient concentration, showed no additional accumulation of dry matter on the stem, or root, but increased their foliar dry matter, and therefore in biomass compared to fertigation plants to 80% concentration of nutrients. From the above it is obtained plants fertigation 1, 20, 40, 60, 80 and 100% concentration of nutrients their relationship aerial part/ root was 4.95, 4.47, 5.56, 5.79, 6.82 and 7.46.



**Figura 2.** Peso seco del tallo, después de cinco meses aplicando diferentes concentraciones de la solución nutritiva de Steiner. En la gráfica, valores con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

**Figure 2.** Dry weight of the stalk, after five months using different concentrations of the nutrient solution Steiner. In the graph, values with the same letter are not significantly different (Tukey, 0.05).

Martínez-Ramírez *et al.* (2013) evaluated the growth of plants *Agave angustifolia* Haw and *A. potatorum* Zucc propagated by conventional methods, to be achieved in three plots differing in soil types, and the total number of plants in each plot were separated into four groups to submit four doses of fertilization. It was reported that plants fertilized with 30-20-15 kg of N-P-K  $ha^{-1}$  had 58.3% more dry biomass unfertilized seedlings. The average positive correlation was also found, highly significant ( $r=0.59$ ;  $P_r \leq 0.01$ ) between the dose of fertigation and stem dry weight.

The data showed that the plants formed higher number of roots in response to increased nutrient supply, up to 80%, since plants fertigation with concentrations of 1, 20, 40,

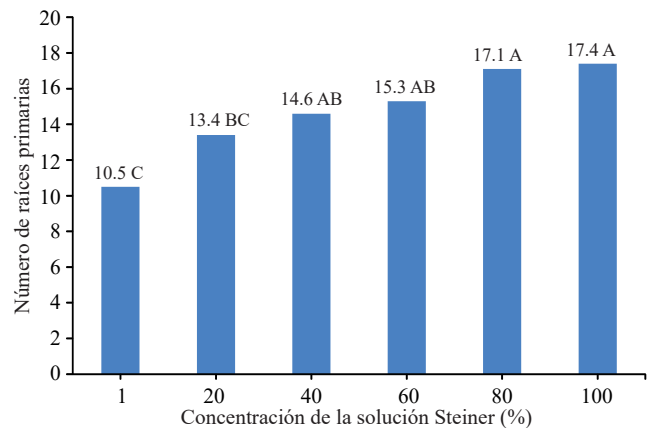


se concentró en las hojas, entre el 4.7 y 5.2% se concentró en el tallo y entre 11.8 y 17.9% se concentró en la raíz. Las plantas que se fertirrigaron a 100% de concentración de nutrimentos, tuvieron 2.05 veces la cantidad de materia seca en el tallo, comparadas a las plantas que se fertirrigaron a 1% de concentración de nutrimentos. Las plantas sometidas al tratamiento de 100% de concentración de nutrimentos, no mostraron acumulación adicional de materia seca en el tallo, ni en la raíz, pero si incrementaron su materia seca foliar, y por lo tanto en la biomasa, comparadas a las plantas fertirrigadas a 80% de concentración de nutrimentos. De lo anterior se obtiene que las plantas fertirrigadas a 1, 20, 40, 60 80 y 100% de concentración de nutrimentos su relación parte aérea/raíz fue de 4.95, 4.47, 5.56, 5.79, 6.82 y 7.46.

Martínez-Ramírez *et al.* (2013), evaluaron el crecimiento de plantas de *Agave angustifolia* Haw y *A. potatorum* Zucc propagadas por métodos convencionales, al establecerlas en tres parcelas que diferían en tipos de suelos, y el total de plantas en cada parcela se separaron en cuatro grupos para someterlos a cuatro dosis de fertilización. Se reportó que las plantas fertilizadas con 30-20-15 kg de N-P-K ha<sup>-1</sup> tuvieron 58.3% más biomasa seca que las plántulas no fertilizadas. También se encontró una correlación media positiva, altamente significativa ( $r=0.59$ ;  $Pr\leq 0.01$ ) entre la dosis de fertirriego y el peso seco del tallo.

Los datos mostraron que las plantas formaron mayor cantidad de raíces en respuesta al abastecimiento creciente de nutrimentos, hasta 80%, ya que las plantas fertirrigadas con concentraciones de 1, 20, 40, 60 y 80% de solución nutritiva de Steiner (1984) tuvieron en promedio 10.5, 13.4, 14.6, 15.3 y 17.1 raíces primarias. En el caso de las plantas que se fertirrigaron a 100% de nutrimentos, éstas ya no formaron significativamente más raíces en comparación a las plantas fertirrigadas a 80% (Figura 3). El análisis de correlación mostró que la cantidad de raíces primarias que formaron las plantas tuvo una correlación media positiva, altamente significativa ( $r=0.66$ ;  $Pr\leq 0.01$ ) con las dosis de fertirriego que recibieron. En el presente trabajo se determinó que la dosis de fertirriego apropiada para los 121 a 270 días de crecimiento *ex vitro* de las plantas de *Agave potatorum* Zucc, micropropagadas, fue 80% de nutrimentos de la formulación Steiner (1984). El manejo de una dosis de fertilización es importante, ya que en caso de plantas micropropagadas de *Agave cocui* Trelease, Díaz *et al.* (2011) se reporta que algunas plantas que recibieron dosis demasiado altas de nitrógeno disminuyeron su cantidad y longitud máxima de raíces, debido al efecto tóxico del fertilizante.

60 and 80% of nutrient solution Steiner (1984) were on average 10.5, 13.4, 14.6, 15.3 and 17.1 taproots. In the case of plants fertigation 100% of nutrients, they no longer formed significantly more roots compared to plants fertigation 80% (Figure 3). Correlation analysis showed that the number of primary roots that formed the plants had a highly significant positive moderate correlation ( $r=0.66$ ;  $Pr\leq 0.01$ ) with fertigation doses they received. In this study it was determined that the appropriate dose of fertigation for 121-270 days *ex vitro* growth of plants *Agave potatorum* Zucc, micropropagation, was 80% of the Steiner nutrient formulation (1984). Handling a fertilization is important because if micropropagated plants *Agave cocui* Trelease, Díaz *et al.* (2011) it is reported that some plants receiving too high doses of nitrogen decreased their amount and maximum root length, due to the toxic effect of fertilizer.



**Figura 3. Cantidad de raíces primarias, después de cinco meses aplicando diferentes concentraciones de la solución nutritiva de Steiner.** En la gráfica, valores con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

**Figure 3. Number of primary roots, after five months applying different concentrations of the nutrient solution Steiner.** In the graph, values with the same letter are not significantly different (Tukey, 0.05).

## Conclusions

The plants *Agave potatorum* Zucc micropropagated-acclimatized, showed further development and growth in the number of leaves, leaf dry weight, leaf area, stem diameter, stem dry weight, number of primary roots, root volume and dry weight roots, in response to increasing doses of nutrient solution Steiner (1984) during the five months that fertigation in nursery.

## Conclusiones

Las plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas-aclimatizadas, mostraron un desarrollo y crecimiento adicional en el número de hojas, peso seco foliar, área foliar, diámetro del tallo, peso seco del tallo, número de raíces primarias, volumen de raíz y peso seco de raíces, en respuesta a las dosis crecientes de solución nutritiva de Steiner (1984) durante los cinco meses que se fertirrigaron en vivero.

El tamaño que obtuvieron las plantas al término del experimento estuvo en relación positiva con la cantidad de nutrimentos en la solución nutritiva. El rango óptimo de fertirriego para las plantas en esta etapa de desarrollo está entre 80 y 100% de la solución universal de Steiner.

## Literatura citada

- Abreu, E. G.; González, R.; Ortiz, P.; Rodríguez, R.; Domech, y Garriga, M. 2007. Evaluación de vitroplantas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) durante la fase de aclimatación. *Cultivos Tropicales*. 28(1):5-11.
- Díaz, J. G.; Rojas, G.; Him de F, Y.; N.; Hernández de B, N.; Torrealba, E. y Rodríguez, Z. 2011. Efecto de la fertilización nitrogenada sobre el crecimiento en vivero de Cocuy (*Agave cocui* Trelease). *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 28 Supl. 1:264-472.
- Domínguez, T. G. y Donayre, G. M. L. 2006. Aclimatación de *Uncaria tomentosa* (willd) *in vitro*, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú. 68 p.
- Domínguez, R. M. S.; Alpuche, S. A. G.; Vasco, M. N. L. y Molphe, B. E. P. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de Agaves Mexicanos. *Rev. Fitotec. Mex.* 31(4):317- 322.
- Enríquez, V. J. R. 2008. La propagación y crecimiento de agaves. Fundación Produce Oaxaca, A. C. Instituto Tecnológico del valle de Oaxaca. Oaxaca. México. 46 p.
- Enríquez del Valle, J. R.; Velasco, V. V. A.; Campos, G. V. A.; Hernández-Gallardo, E.; Rodríguez Mendoza, M. N. 2009. *Agave angustifolia* plants grown with different fertigation doses and organic substrates. *Acta Hort.* 843:49-55.
- Enríquez del Valle, J. R.; Cruz-Valdez, I.; Carrillo-Castañeda, G. 2012. Acclimatization of *Agave angustifolia* Haw. vitroplants in inert substrates and fertigated with different nutrimental dose. *Acta Hort.* 947:101-104.
- Enríquez, V. J. R.; Estrada, S. A.; Rodríguez, O. G.; Velasco, V. V. A. y Campos, A. G. V. 2013. Sustrato y dosis de fertirriego en la aclimatación de vitroplantas de *Agave americana* var. *Oaxacensis*. *Rev. fca UNCUYO*. 45(2):341-348.
- García-Mendoza, A. J. 2007. Los agaves de México. *Ciencias*. 87:14-23.
- Garriga, C. M.; González, O. G.; Alemán, G. S.; Abreu, C. E.; Quiroz, B. K.; Caligari, P.D.S. and García González, R. 2010. Management of auxin-cytokinin interactions to improve micropropagation protocol of henequen (*Agave fourcroydes* Lem.). *Chilean J. Agric. Res.* 70(4):545-551.
- The size plants obtained at the end of the experiment was in positive relationship with the amount of nutrients in the nutrient solution. The optimum range of fertigation for plants at this stage of development is between 80 and 100% of the Steiner universal solution.

*End of the English version*



- INEGI. 2010. Anuario estadístico del estado de Oaxaca. Ed. INEGI. México.
- Martínez, M. L.; Velasco, V. V. A.; Ruiz, L. J.; Enríquez, V. J. R.; Campos, Á. G. V. y Montañón, L. M. L. 2013. Efecto del nitrato de calcio y sustratos en el rendimiento del tomate. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 6:1176.
- Martínez-Ramírez, S.; Trinidad, S. A.; Robles, C.; Galvis, S. A.; Hernández, M. T. M.; Santizo, R. J. A.; Bautista, S. G. y Pedro, S. E. C. 2012. Crecimiento y sólidos solubles de *Agave potatorum* Zucc. inducidos por riego y fertilización. *Rev. Fitotec. Mex.* 35(1):61-68.
- Martínez-Ramírez, S.; Trinidad, S. A.; Bautista, S. G. y Pedro, S. E. C. 2013. Crecimiento de plántulas de dos especies de mezcal en función del tipo de suelo y nivel de fertilización. *Rev. Fitotec. Mex.* 36(4):38-393.
- Medrano, V. A.; Orea, C. D. and Villanueva, N. E. 2010. Mezcal *Agave* microplantlets development in different substrates. *Proc. IV<sup>th</sup> IS on Acclim. and Establ. Of Micropropagated Plants. Acta Hort.* 865:273-276.
- Molina, G. J. A.; Botello, J. E.; Estrada, A.; Navarrete, J. L.; Jiménez, H.; Cárdenas, M. y Rico, R. 2007. Compuestos volátiles en el mezcal. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 6:41-50.
- Moya, J. A. T. 2002. Riego localizado y fertirrigación. Edit. Mundi-Prensa. 3ª edición. Madrid España. 534 p.
- Pérez, N. E. y Casas, A. 2007. Use, extraction rates and spatial availability of plant resources in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico: the case of Santiago Quiotepec, Oaxaca. *J. Arid Environments.* (70):356-379.
- Salazar, E.; González, P. y Hernández, C. 2009. Multiplicación *in vitro* de *Agave cocui* Trelease a través de yemas axilares. *Agron. Tropical.* 59(2):129-135.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution, ISOSC (Proceedings). Sixth International Congress on Soilless Culture. Lunteren Wageningen. The Netherlands. 633-650 pp.
- Teixeira, S. J. A.; Dam, D. T. and Tanaka, G. M. 2005. *In vitro* acclimatization of banana and *Cymbidium*. *Int. J. Bot.* 1:41-49.
- Uvalle, B. J. X. y Vélez, G. C. 2007. Nutrición del Agave tequilero (*Agave tequilana* Wever var. azul). *In: Rulfo, V. F. O.; Pérez, D. J. F.; del Real Laborde, J. I.; Byerly, M. and Keir, F. (Eds.). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de Agave tequilana Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro.* 69-88 pp.
- Valenzuela-Sánchez, K. K.; Juárez-Hernández, R. E.; Cruz-Hernández, A.; Olalde-Portugal, V.; Valverde, M. E. y Paredes-López, O. 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular and Develop. Biol.-Plant.* 42(4):336-340.

Vera, G. A. M.; Santiago, P. A. y López, M. G. 2009. Compuestos volátiles aromáticos generados durante la elaboración de mezcal de *Agave angustifolia* y *Agave potatorum*. Rev. Fitotec. Mex. 32:273-279.

Vera-Guzmán, A. M.; Guzmán-Gerónimo, R. I. and López, M. G. 2010. Major and minor compounds in a Mexican spirit, young mezcal coming from two *Agave* species. Czech J. Food Sci. 28:127-132.