



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

PROPAGACIÓN *in vitro*, ACLIMATACIÓN Y DESARROLLO EN VIVERO DE *Agave potatorum* Zucc

TESIS QUE PRESENTA:

Ariadna Ivon Bautista Castellanos

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS

DIRECTOR:



Dr. José Raymundo Enríquez del Valle

Ex-Hacienda de Nazareno Xoxocotlán, Oaxaca.
Agosto de 2019.



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

PROPAGACIÓN *in vitro*, ACLIMATACIÓN Y DESARROLLO EN VIVERO DE *Agave potatorum* Zucc

TESIS QUE PRESENTA:

Ariadna Ivon Bautista Castellanos

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS

DIRECTOR:



Dr. José Raymundo Enríquez del Valle

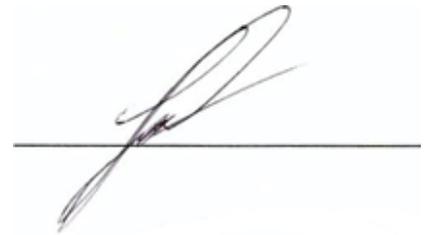
Ex-Hacienda de Nazareno Xoxocotlán, Oaxaca.
Agosto de 2019.

La presente Tesis titulada: Propagación *in vitro*, aclimatación y desarrollo en vivero de *Agave potatorum* Zucc., se realizó bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS

DIRECTOR:

DR. JOSÉ RAYMUNDO ENRÍQUEZ DEL VALLE

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J.R.E.', written over a horizontal line.

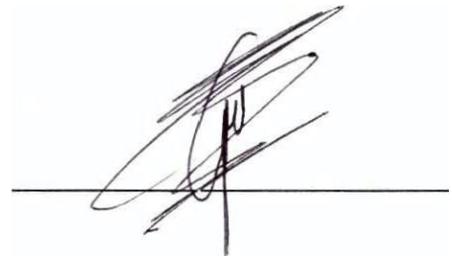
ASESOR:

DR. VICENTE ARTURO VELASCO VELASCO

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Vicente', written over a horizontal line.

ASESOR:

DR. GERARDO RODRÍGUEZ-ORTIZ

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Gerardo', written over a horizontal line.



| | |
|---|--------------------------|
| Nombre de la Información Documentada: Autorización de entrega de Tesis DEPI. | Código: ITVO-AC-PR-08-03 |
| | Revisión: 0 |
| Referencia a la Norma ISO 9001:2015 8.2.1, 8.2.2, 8.2.3, 8.5.2 | Página 1 de 1 |

EXPEDIENTE: 20DIT0009G
Nazareno, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, 19/Agosto/2019
No. de Oficio: DEPI/682/2019
Asunto: **Autorización.**

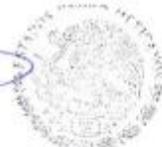
ARIADNA IVON BAUTISTA CASTELLANOS
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS
EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS
P R E S E N T E

Con base en los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México, respecto a la presentación del examen de grado, me es muy grato comunicarle que esta División de Estudios de Posgrado e Investigación a mi cargo, **AUTORIZA** la entrega del documento final de su tesis en formato digital (PDF) titulada: "Propagación *in vitro* aclimatación y desarrollo en vivero de *Agave potatorum* Zucc".

Cuyo contenido ha sido revisado y aprobado por su Comité Tutorial y cumple en lo general con el formato establecido para este documento, como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Productividad en Agroecosistemas.

Sin más por el momento le felicito cordialmente por el logro de esta meta y le reitero el respaldo institucional de su Alma Mater.

ATENTAMENTE
"Ciencia y Tecnología para el Campo"



SALVADOR LOZANO TREJO
ENCARGADO DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

S. E. P.
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
VALLE DE OAXACA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN
Clave: 20DIT0009G
Nazareno Xoxocotlán, Oax.



| | |
|---|--------------------------|
| Nombre de la Información Documentada: Autorización de entrega de tesis del Comité. | Código: ITVO-AC-PR-08-02 |
| | Revisión: 0 |
| Referencia a la Norma ISO 9001:2015 8.2.1, 8.2.2, 8.2.3, 8.5.2 | Página 1 de 1 |

Nazareno Xoxocotlán, Oaxaca, a 19 de agosto de 2019

ARIADNA IVON BAUTISTA CASTELLANOS
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN PRODUCTIVIDAD EN AGROECOSISTEMAS
P R E S E N T E

Los que suscriben, miembros de su Comité Tutorial, le comunicamos que hemos revisado el contenido de su tesis "Propagación *in vitro* aclimatación y desarrollo en vivero de *Agave potatorum* Zucc". Por lo que con base en los lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México se le otorga la **AUTORIZACIÓN** para que proceda a la entrega del documento final de la misma en formato digital (PDF); para continuar con su trámite y asignarle la fecha de su examen de grado.

Sin más por el momento nos permitimos reconocer su esfuerzo y felicitarle por el logro de su documento de tesis.



JOSÉ RAYMUNDO ENRÍQUEZ DEL VALLE
DIRECTOR DE TESIS



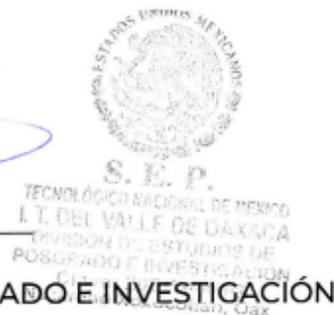
VICENTE ARTURO VELASCO VELASCO
ASESOR



GERARDO RODRÍGUEZ ORTIZ
ASESOR



SALVADOR LOZANO TREJO
ENCARGADO DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



El presente trabajo se llevó a cabo con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través el número de becario 848699, con el tema de investigación "Propagación *in vitro*, aclimatación y desarrollo en vivero de *Agave potatorum* Zucc".

ÍNDICE GENERAL

| | Pág |
|---|------------|
| INDICE DE CUADROS | iii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | v |
| RESUMEN | vi |
| SUMMARY | vii |
| CAPITULO I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 2.1 Género Agave y Hábitat..... | 4 |
| 2.2 Metabolismo ácido de las crasuláceas..... | 5 |
| 2.3 Usos del Agave | 6 |
| 2.4 Descripción botánica de <i>Agave potatorum</i> Zucc..... | 7 |
| 2.5 Situación de <i>Agave potatorum</i> Zucc..... | 10 |
| 2.6 Micropropagación..... | 11 |
| 2.6.1 Requisitos para enraizar cultivo de células, tejido y órganos vegetales..... | 13 |
| 2.7 Reguladores de crecimiento..... | 14 |
| 2.7.1 Auxinas..... | 14 |
| 2.7.2 Citocininas..... | 15 |
| 2.8 Organogénesis..... | 16 |
| CAPITULO III. Sales minerales y citocininas en la propagación <i>in vitro</i> de dos procedencias de <i>Agave potatorum</i> Zucc | 18 |
| 3.1 Introducción..... | 20 |
| 3.2 Materiales y métodos..... | 22 |
| 3.2.1 Obtención del material vegetativo..... | 22 |
| 3.2.2 Multiplicación de brotes..... | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.3 Análisis estadísticos..... | 24 |
| 3.3 Resultados y discusión | 25 |
| 3.4 Conclusiones..... | 32 |
| 3.5 Literatura citada..... | 32 |
| CAPITULO IV. Enraizado de brotes <i>in vitro</i> aclimatación de plantas de <i>Agave potatorum</i> Zucc..... | 35 |
| 4.1 Introducción..... | 36 |
| 4.2 Materiales y métodos..... | 39 |
| 4.2.1 Obtención del material vegetal | 39 |
| 4.2.2 Experimento 1: enraizado de brotes..... | 40 |
| 4.2.4 Experimento 2: Aclimatación de plantas micropropagadas..... | 41 |
| 4.3 Resultados y discusión..... | 42 |
| 4.3.1 Experimento 1: enraizado de brotes..... | 42 |
| 4.3.2 Aclimatación de plantas micropropagadas..... | 46 |
| 4.4 Conclusiones..... | 50 |
| 4.5 Literatura citada..... | 51 |
| CAPITULO V. Crecimiento y tasa de asimilación de CO₂ DE <i>Agave potatorum</i> Zucc., abastecidas a diferentes niveles nutrimentales..... | 54 |
| 5.1 Introducción | 56 |
| 5.2 Materiales y Métodos | 58 |
| 5.2.1 Material Vegetal..... | 58 |
| 5.2.2 Área foliar..... | 60 |
| 5.2.3 Medición de la tasa de asimilación de CO ₂ y análisis estadístico..... | 60 |
| 5.3 Resultados y Discusión..... | 61 |
| 5.3.1 Experimento: desarrollo de plantas en vivero..... | 61 |
| 5.3.2 Tasa de asimilación de CO ₂ | 64 |
| 5.3.3 Análisis estadísticos del área foliar y la tasa de asimilación de CO ₂ | 69 |
| 5.4 Conclusiones | 71 |
| 5.5 Literatura citada..... | 72 |
| CAPITULO VI. CONCLUSIONES GENERALES..... | 75 |
| CAPITULO VII. RECOMENDACIONES..... | 77 |
| CAPITULO VIII. LITERATURA CITADA..... | 78 |

INDICE DE CUADROS

| Cuadro | | Pág. |
|--------|---|------|
| 1 | Composición de los 48 tratamientos del experimento..... | 25 |
| 2 | Resumen del análisis de varianza de diversas variables de <i>Agave potatorum</i> Zucc., de dos procedencias, cultivados <i>in vitro</i> en medios de cultivo que variaron en concentraciones de citocininas y sales minerales..... | 27 |
| 3 | Características de propágulos de <i>Agave potatorum</i> Zucc., cultivados <i>in vitro</i> en función de niveles de factores principales..... | 30 |
| 4 | Resumen del análisis de varianza de diversas características de plantas de <i>Agave potatorum</i> Zucc, obtenidas en la etapa de enraizado de brotes, en medios de cultivo, que variaron en concentración de auxinas y sales minerales a los 66 días de incubación..... | 44 |
| 5 | Características de enraizado de brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc., cultivados <i>in vitro</i> en función de las sales minerales a los 66 días..... | 45 |
| 6 | Contrastes ortogonales de características de enraizado de brotes de <i>Agave potatorum</i> Zucc., cultivados <i>in vitro</i> a los 66 días..... | 46 |
| 7 | Resumen de catorce análisis de varianza de características de plantas de <i>Agave potatorum</i> Zucc., micropropagadas, que durante 90 días de su aclimatación en invernadero recibieron solución nutritiva (Steiner, 1984) en concentraciones diferente.. | 48 |
| 8 | Características plantas de <i>Agave potatorum</i> Zucc., micropropagadas aclimatizadas en invernadero por 90 días..... | 49 |

| | | |
|----|--|----|
| 9 | Compuesto químico de las soluciones nutritivas de Steiner (1984) y California (Ellis y Swaner, 1963, citado por Sánchez-del Castillo, 1989) en concentración completa (100%)..... | 59 |
| 10 | Resumen del análisis de varianza de variables de <i>A. potatorum</i> en la fase de vivero, fertilizadas con diferentes dosis de soluciones nutritivas durante doce meses..... | 62 |
| 11 | Características de plantas micropropadas-aclimatizadas de <i>Agave potatorum</i> , en vivero fertilizadas con diferentes dosis de soluciones nutritivas durante doce meses..... | 63 |
| 12 | Resumen del análisis de varianza de variables de la tasa de asimilación de CO ₂ de <i>A. potatorum</i> fertilizadas con diferentes dosis de soluciones nutritivas..... | 70 |
| 13 | Características de la tasa de asimilación de CO ₂ de plantas micropropadas-aclimatizadas de <i>Agave potatorum</i> , en la fase de desarrollo en vivero, fertilizadas con diferentes dosis de soluciones nutritivas durante doce meses..... | 71 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura | | Pág. |
|---------------|--|-------------|
| 1 | Morfología, <i>Agave potatorum</i> Zucc..... | 9 |
| 2 | Planta de <i>Agave potatorum</i> | 9 |
| 3 | Hoja de <i>A. potatorum</i> | 9 |
| 4 | Inflorescencia de <i>A. potatorum</i> | 10 |
| 5 | Semillas de <i>A. potatorum</i> | 10 |
| 6 | Formación de brotes: A) procedencia de San Pedro Totolapan a los 15 y 60 días del experimento. B) procedencia de Sola de Vega a los 15 y 60 días..... | 26 |
| 7 | Plantas obtenidas <i>in vitro</i> a partir del enraizado de brotes a los 66 días de incubación..... | 43 |
| 8 | Plantas micropropagadas de 60 días de aclimatación..... | 47 |
| 9 | Plantas de <i>A. potatorum</i> fertirrigadas con las concentraciones de solución nutritiva a los 90 días de aclimatación en invernadero..... | 48 |
| 10 | Gráficas de la de tasa fotosintética instantánea neta (TIFsN) de plantas micropropagadas-aclimatizadas de <i>A. potatorum</i> , fertirrigadas con diferentes dosis de concentración de soluciones nutritivas (California y Steiner). La medición de TIFsN en el periodo en que el suelo tuvo humedad por arriba del punto de marchitez permanente..... | 66 |
| 11 | Gráficas de la de tasa fotosintética instantánea neta (TIFsN) de plantas micropropagadas-aclimatizadas de <i>A. potatorum</i> , fertirrigadas con diferentes dosis de concentración de soluciones nutritivas (California y Steiner). La medición de TIFsN en el periodo en que el suelo tuvo humedad por debajo del punto de marchitez permanente..... | 68 |

RESUMEN

Agave potatorum se usa como materia prima para la elaboración de la bebida alcohólica denominada mezcal y por su creciente demanda se propone micropropagar esta especie. Se evaluó la respuesta de proliferación de brotes en función de dos procedencias, Sola de Vega y San Pedro Totolapan, que se establecieron en medios de cultivo con sales minerales MS, concentraciones diferentes (75 y 100%), 0, 1, 2 y 3 mg L⁻¹ de N6-bencilaminopurina, y 0, 1 y 2 mg L⁻¹ de kinetina. En 60 días de incubación, los brotes de ambas procedencias formaron en promedio 15.3 y 16 brotes, respectivamente, con 3 mg L⁻¹ de BAP, 0 y 2 mg L⁻¹ de KIN con las sales minerales al 75%. Se evaluó el enraizado de brotes de San Pedro Totolapan, al transcurrir 66 días de incubación, el 90% de brotes habían formado raíces con AIB a 0.1 mg L⁻¹ y 0.5 mg L⁻¹, formando en promedio 4.45 y 4.72 raíces. A los 90 días de aclimatación el 87% de plantas sobrevivió, la aplicación de solución Steiner al 50% promovió el mejor crecimiento en altura de la hoja más larga, número de hojas, diámetro del tallo, peso fresco y peso seco de la planta. Durante 12 meses se evaluó el crecimiento en vivero de plantas aclimatizadas que recibieron dosis de fertilización diferente de dos soluciones nutritivas, las plantas con California al 100% presentaron 27.7 hojas, un diámetro de roseta de 52.3 cm y altura de 29.5 cm que fueron más grandes a las plantas con Steiner al 100%. Al evaluar la asimilación de CO₂ de las plantas, se observó que cuando la RFA, disminuyo a 300 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a las 16:00 hrs, inicio la apertura estomática alcanzado valores de asimilación entre las 19:00 y 22:00 h. Las plantas con Cal-100% mostraron valores mayores de asimilación de CO₂ (17 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) que las plantas con St-100% con valor máximo de 11 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

SUMMARY

Agave potatorum is used as raw material for the elaboration of the alcoholic beverage called mezcal and due to its growing demand it is proposed to micropropagate this species. Outbreak proliferation response was evaluated based on two sources, Sola de Vega and San Pedro Totolapan, which were established in culture media with MS mineral salts, different concentrations (75 and 100%), 0, 1, 2 and 3 mg L⁻¹ of N6-benzylaminopurine, and 0, 1 and 2 mg L⁻¹ of kinetin. In 60 days of incubation, the outbreaks of both sources formed an average of 15.3 and 16 outbreaks, respectively, with 3 mg L⁻¹ of BAP, 0 and 2 mg L⁻¹ of KIN with 75% mineral salts. Rooting of shoots of San Pedro Totolapan was evaluated, after 66 days of incubation, 90% of shoots had formed roots with AIB at 0.1 mg L⁻¹ and 0.5 mg L⁻¹, forming on average 4.45 and 4.72 roots. At 90 days of acclimatization 87% of plants survived, the application of 50% Steiner solution promoted the best growth in length of the longest leaf, number of leaves, stem diameter, fresh weight and dry weight of the plant. During 12 months the growth in nursery of acclimatized plants that received different fertilization doses of two nutritive solutions was evaluated, the plants with 100% California presented 27.7 leaves, a rosette diameter of 52.3 cm and a height of 29.5 cm that were larger to plants with 100% Steiner. When evaluating the CO₂ assimilation of the plants, it was observed that when the RFA, decreased to 300 μmol photon m⁻² s⁻¹ at 16:00 hrs, the stomatal opening started reached assimilation values between 19:00 and 22:00 h. Plants with Cal-100% showed higher values of CO₂ assimilation (17 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹) than plants with St-100% with a maximum value of 11 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹.

CAPITULO I.

INTRODUCCIÓN

El género *Agave*, se ubica en la familia *Agavaceae* incluye varias especies de plantas adaptadas a condiciones de aridez. Tienen una forma característica de roseta y poseen raíces muy ramificadas, cutícula gruesa, hojas suculentas con estomas hundidos y metabolismo fotosintético tipo CAM (Domínguez-Rosales *et al.* 2008).

El grupo de especies del género *Agave* son conocidas comúnmente como magueyes, han sido aprovechadas por los pobladores de México desde tiempos prehispánicos. Este género se le encuentra en la mayor parte del continente americano, pero muestra su máxima diversidad y evolución en territorio de México (García-Mendoza, 2004). Y culturalmente se les considera representativas de la flora mexicana. Se han reportado que en México existen aproximadamente 165 especies de agave, muchos de los cuales poseen gran

potencial agrícola que ha llevado a la sobreexplotación de muchas de ellas, varias de ellas cultivadas, pero numerosas aun en condición silvestre. (Espinosa-Barrera, 2015). En el suroeste de México, se practica el aprovechamiento intensivo no planificado de poblaciones silvestres de agaves, entre ellos *A. potatorum*, el tallo (piña) de esta especie se usa como materia prima para la elaboración de la bebida alcohólica denominada mezcal (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013) sus contenidos de carbohidratos y otros compuestos orgánicos, así como las particularidades del proceso artesanal de elaboración de la bebida, le confieren el producto características particulares de aroma y sabor apreciadas por los consumidores.

Esta bebida destilada ha ganado popularidad desde hace alrededor de dos décadas, y su demanda aumenta paulatinamente, de tal forma que su comercialización ha alcanzado dimensiones internacionales (Torres *et al.*, 2013). Lo que ha provocado la notable disminución de sus poblaciones, aunque no documentada.

A principios de la década de 1990's era notable la escases de plantas silvestres de *A. potatorum*, por lo que grupos de campesinos en la zona de Sola de Vega, sierra Sur de Oaxaca implementaron actividades de colecta de semilla, su germinación, crecimiento de las plantas en vivero y establecimiento de pequeñas plantaciones.

Por lo que se deben implementar acciones para lograr la conservación de agaves mediante la colecta de germoplasma, su propagación y establecer plantaciones

(Pérez-Molphe *et al.*, 2012), una de las alternativas para producir gran cantidad de plantas, es la propagación asexual mediante la micropropagación o cultivo *in vitro* (Monja-Mio *et al.*, 2015), la aclimatación en invernadero y desarrollo en vivero de las plantas micropropagadas (Enríquez-del Valle *et al.* 2016), como una alternativa complementaria a los procedimientos de propagación convencional (Enríquez-del Valle, 2008) para producir cantidad suficiente de plantas con las características genotípicas del material inicial seleccionado, ya que a partir de porciones del tallo (tejido meristemático) asépticos se expresa la totipotencialidad de las células y tejidos, al establecerlos en el medio de cultivo que conlleva las sales minerales, vitaminas, carbohidratos, y los reguladores de crecimiento (Kehie y Kumaria 2012). Hay estudios que muestran que cada especie de *Agave* requiere concentraciones y combinaciones particulares de los reguladores de crecimiento para lograr una eficiente regeneración de vitroplantas (Ramírez-Malagón *et al.*, 2008).

Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue evaluar componentes del medio de cultivo para la micropropagación de *Agave potatorum*, en las etapas de: multiplicación de brotes, el enraizado de brotes; y durante la aclimatación en invernadero, desarrollo en vivero, el crecimiento y condición nutrimental de las plantas que se fertirrigaron con variantes de soluciones nutritivas, así como determinar la tasa de asimilación fotosintética de CO₂ durante 24 horas.

CAPITULO II.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Género Agave y Hábitat

El género *Agave*, tradicionalmente ha sido clasificado dentro de la familia Agavaceae. Se distribuye en el Continente Americano, desde California (centro-oeste de los Estados Unidos) hasta Perú Bolivia y Paraguay (Gentry. 1982). En Oaxaca los Agaves se desarrollan en sitios planos, o con pendientes ligeras a pronunciadas, sobre suelos arenosos derivados de rocas calizas, en un intervalo altitudinal que va de los 1300 a 2400 m, en climas áridos y semiáridos. Forma parte de la selva baja caducifolia, del matorral xerófilo con cactáceas columnares y del matorral xerófilo con *Quercus* (García-Mendoza, 2004).

Son especialmente abundantes en los diferentes tipos de matorral xerófilo, en bosque tropical caducifolio, bosque espinoso y pastizal. En el matorral xerófilo pueden llegar a ser dominantes o codominantes, de tal manera que las comunidades vegetales reciben nombres que aluden a sus formas de vida,

como lo es el matorral rosetófilo. Algunas especies de Agaves prosperan en tipos de vegetación de clima templado, preferentemente en el bosque de encino (*Quercus*) y, en menor proporción, en el de coníferas y el mesófilo de montaña. Los tipos de suelos que favorecen el crecimiento de los agaves son diversos y pueden ser tanto de origen ígneo como sedimentario principalmente calizas. Esta diversidad de ambientes es uno de los factores que ha favorecido el gran número de taxones en México (García-Mendoza, 2004).

2.2 Metabolismo ácido de las crasuláceas

El metabolismo ácido de las crasuláceas es un proceso por el cual las plantas fijan CO₂, muy parecido al proceso C₄, con la diferencia de que la enzima reacciona en la oscuridad y con demandas evapotranspirativas bajas. Los agaves son plantas con metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), estas plantas asimilan el CO₂ atmosférico en ácido de cuatro carbonos, que predomina de noche y subsecuente lo refijan durante el siguiente día vía ciclo de Calvin. Una de sus características más notorias, es la apertura de sus estomas durante la noche y cerrados durante la mayor parte del día, esto con la finalidad de evitar una pérdida mínima de agua y fotorrespiración reducida (Herppich y Peckmann, 2000).

Las plantas CAM acumulan ácido orgánico en la vacuola durante la fase nocturna, en forma de ácido málico, y para acomodar estos grandes cambios diurnos en ácidos de cuatro carbonos y carbohidratos, las plantas CAM exhiben grandes cantidades de PEPC para la fijación nocturna de CO₂ y poseen sistemas de enzimas decarboxilasas activas para poder proveer refijación diurna de CO₂, mediante el ciclo de Calvin (Lüttge, 2004).

El almacenamiento del ácido málico hace que las plantas CAM tengan un sabor más amargo o ácido durante la noche que durante el día (Nobel, 1998).

2.3 Usos del Agave

Desde tiempos prehispánicos diversas especies del género *Agave* se les aprovecha de variadas formas a lo largo de todo el país, para la obtención de fibras usadas en cordelería, que en las cuatro décadas recientes ha perdido importancia debido a la sustitución de las fibras de origen vegetal por fibras sintéticas. Actualmente uno de los usos más importantes de varias especies de agave, *A. tequilana*, *A. salmiana*, *A. angustifolia*, *A. potatorum*, etc es como materia prima en la elaboración de bebidas alcohólicas. Se obtienen dos tipos de bebidas del agave: el fermentado (aguamiel y pulque) y el destilado (mezcal y tequila) (Martínez, 2012).

Algunas especies de maguey, tales como *A. lechuguilla*, y *A. fourcroydes*, también ha sido muy utilizado para la obtención de fibras. Se ha encontrado que en diferentes pueblos se utiliza la fibra del *Agave* para fabricar cordones, redes, bolsas, cestas, tapetes, cobertores, ropa (particularmente mandiles), sandalias, trenzas, cepillos de cabeza, brochas de pintura, hilo para coser, hilo para pescar, instrumentos musicales, entre otros (Kolendo, 2000).

Las flores del *Agave* se utilizan como alimento, éstas se recolectan de plantas silvestres o cultivadas y con ellas se preparan diversos guisos que se consumen durante la época de floración. Las hojas o pencas se emplean como saborizante al cocer la barbacoa y la cutícula de ellas se extrae para envolver el mixitote (García-Mendoza, 1998).

2.4 Descripción botánica de *Agave potatorum* Zucc.

Agave potatorum (Figura 1) es una especie monocárpica, que tarda de 8 a 12 años en florecer, la cual no presenta reproducción asexual. Por lo general es una planta acaulescente, de rosetas pequeñas con 50 a 80 hojas de color verde glauco (Figura 2), cortamente ovado-lanceoladas, planas, con márgenes ondulados a profundamente crenados, con los dientes y la espina terminal de las hojas de color castaño (Gentry, 1982). Hojas 30-60(-100) por planta, 15-35 cm largo, (5-)8-10 cm ancho (Figura 3), ovadas, oblongas o lanceoladas, suculentas, erectas, flexibles a rígidas, planas o algo cóncavas hacia el ápice, engrosadas hacia la base, glaucas a verde-glaucas; margen sinuado a crenado, mamilas 4-7(-10) mm alto; dientes de la parte media, 4-6(-12) mm largo, 4-6(-8) mm ancho, retrorsos, antrorsos o rectos, castaños a grisáceos, separados por 1-3 cm; espina 3-4 cm largo, 0.4-0.7 cm ancho, recta o sinuosa, aguda, ampliamente acanalada a plana en el haz, decurrente por menos de 1.0 cm, castaña a grisácea.

Inflorescencia (escapo o quiate) 3-5(-6) m alto (Figura 4), porción fértil en la mitad o tercio superior, paniculada, abierta, con 11-25 ramas primarias 10-30 cm largo, separadas entre sí por 15-30 cm, a veces con ramas secundarias 0.5-4 cm largo; pedúnculo verde a pardo-rojizo, brácteas del pedúnculo 12-20 cm largo, 3.5-4 cm ancho en la base, triangulares, cartáceas, con algunos dientecillos en el margen, espina 0.5-2.5 cm largo, 0.7-1 cm ancho, pardo-rojiza; brácteas de las ramas primarias 5-8 cm largo, 2-5 cm ancho, ovadas, amplexicaules.

Flores (15)20-40 por umbela, (5)5.5-7 cm largo, campanuladas a algo urceoladas, suculentas, verde amarillentas con tintes purpúreos o rojizos, ovario verde; pedicelos 1-

1.5 cm largo; ovario 2.5-3 cm largo, 4-6 mm ancho, cilíndrico a ligeramente triquetro, cuello 2-3(-5) mm largo, tubo (1-)1.3-1.6 cm largo, (0.8)1.3-1.8 cm diámetro en la porción distal, sulcado; tépalos 1.2-1.5(-2) cm largo, 3-6 mm ancho, ápice cuculado, duro, los internos aquillados; filamentos 3-4(-4.5) cm largo, aplanados adaxialmente, insertados a la mitad o en el tercer cuarto superior del tubo, amarillentos, a veces con tintes purpúreos, anteras 1.5-2.5 cm largo, 2-3 mm ancho, rectas, versátiles, amarillentas; estilo 5.5-6 cm largo, estigma claviforme, trilobado. Cápsulas (3.5-) 4-6 cm largo, 1.5-2 cm ancho, oblongas, estipitadas, rostradas. Semillas 5-6 mm largo, 4-5 mm ancho, lunulares, con un ala apenas perceptible, aplanadas, negras (Figura 5).

En el extremo de los Valles Centrales de Oaxaca, en los distritos Mixe y Tlacolula al este, Miahuatlán y Sola de Vega al sur, *Agave potatorum* presenta una mayor variación en los órganos vegetativos y reproductivos (García-Mendoza, 2010).

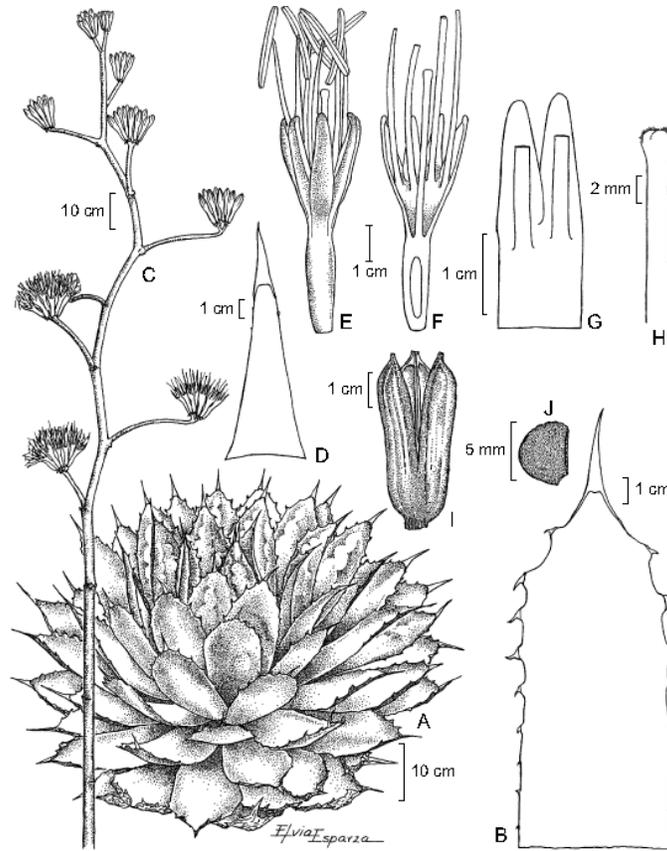


Figura 1. Morfología, *Agave potatorum* Zucc (García-Mendoza, 2010). A. roseta; B. hoja; C inflorescencia; D. bráctea del pedúnculo; E. flor; F. flor disecada; G. detalle de la inserción del filamento; H. estilo y estigma; I. cápsula; J. semilla.



Figura 2 y 3. Planta de *A. potatorum* Zucc y hoja de *A. potatorum*



Figura 4 y 5. Inflorescencia y semillas de *A. potatorum* Zucc.

2.5 Situación de *Agave potatorum* Zucc.

Para la elaboración de mezcal en el Estado de Oaxaca, se utilizan diversas especies de agave, siendo *Angustifolia* Haw, la más demandada, sin embargo, el agave Tobalá (*Agave potatorum* Zucc) es muy apreciado por productores y consumidores debido al sabor que le proporciona al mezcal (Martínez-Ramírez *et al.*, 2013). Una planta de *A. potatorum* tarda de seis a ocho años en alcanzar la madurez reproductiva, momento en que la cantidad de azúcares en el tallo llega a su máximo y es cosechada (Illsey *et al.*, 2005).

Los productores recolectan los tallos o “piñas” de poblaciones silvestres antes que las plantas puedan emitir flores y semillas, afectando a ésta especie puesto que no se tiene

registro de que presente algún tipo de reproducción asexual; esta situación ha generado una considerable disminución de las poblaciones silvestres (Sheinvar, 2008).

En vista de su crecimiento y las potencialidades que tiene el mezcal, tanto a nivel nacional como internacional, surge la necesidad de actualizar el conocimiento de la situación en la que se desarrolla, cuáles son las debilidades, fortalezas, oportunidades y amenazas que rigen su producción.

2.6 Micropropagación

El cultivo “*in vitro*” ha demostrado ser una herramienta tecnológica para la reproducción intensiva de plantas, siendo una vía muy competitiva con relación a los procedimientos tradicionales de propagación vegetativa (Montes-Cruz *et al.* 2016). La micropropagación vegetal es una técnica de multiplicación asexual, o de clonación que permite producir poblaciones uniformes de plantas. Los primeros intentos de cultivos de tejidos vegetales datan de principios del siglo XX, en 1902 se realizaron los primeros intentos en el cultivo de tejidos vegetales (Hurtado, 1987) cuya finalidad era primordialmente académica, pero durante las seis décadas siguientes se acumularon experiencias, conocimientos de fisiología vegetal, desarrollos técnicos, sustancias, que hicieron posible que a principios de la década de 1970’s Murashige (1974) describiera los avances logrados y las aplicaciones de la técnica.

La micropropagación tiene usos significativos en la propagación vegetativa de especies y cultivares de importancia hortícola y forestales. Estos procedimientos tienen una amplia

gama de aplicaciones que implica manipulación y regeneración del mismo, mediante el uso de callo, células o protoplastos. Tales operaciones son herramientas importantes en genética, fitomejoramiento y en estudios de fisiología (Hartmann y Kester, 2003). La micropropagación es la tecnología más difundida de propagación masiva de plantas vía organogénesis. Consiste en un conjunto de procedimientos asépticos de cultivo de órganos, tejidos o células que permitan la producción de poblaciones de plántulas idénticas a la planta original de la que se derivan (Álvarez, 2011).

Es considerada como una extensión de la mayoría de los métodos de propagación convencional y consiste en cultivar segmentos, conocidos como explantes de plantas seleccionadas que son cultivados *in vitro* en un medio de cultivo conformado por macro y micronutrientes, azúcares como fuente de carbono, reguladores de crecimiento, vitaminas, un agente gelificante para proporcionarle sostén a los explantes vegetales, así como condiciones de luz y temperatura que son específicas de acuerdo a la especie vegetal con la que se esté trabajando (George, 1993; Calva-calva y Pérez-Vargas, 2005). Cuando ya se cuenta con un procedimiento para el cultivo *in vitro* de las especies de interés, y se tienen cultivos asépticos adaptados al ambiente *in vitro*, es posible iniciar la micropropagación para la rapidez en la multiplicación clonal de genotipos de plantas superiores idénticas a la planta madre, libres de enfermedades y plagas (Smith & Drew, 1990).

Si se combinan diferentes niveles de auxinas y citocininas pueden darse varias respuestas alternativas: la presencia de niveles relativamente altos de ambas hormonas conduce solo a una multiplicación celular con escasa diferenciación. Si existiese un nivel

relativamente alto de citocininas vs. auxinas, el tejido manifiesta la formación de nuevos brotes a cambio de la intensa proliferación celular vista antes. Si, por el contrario, los niveles de ambas hormonas se invierten de manera de tener una relación más alta de auxinas vs. citocininas, la expresión del tejido cambia y se originan raíces. De manera que, las células vegetales que cuentan con núcleo y tienen un grado de diferenciación relativo, pueden bajo ciertas condiciones revertir a su estado meristemático y expresar luego diferentes respuestas conducentes todas a la generación de órganos y plantas. Se trata de células totipotentes.

Esta propiedad se ha usado para realizar ciencia básica en que se describen los procesos y mecanismos biológicos de la morfogénesis, y desarrollo de plantas completas. Tales conocimientos se aprovechan para desarrollar tecnologías que aumenten la eficiencia de procesos productivos. Los avances logrados permiten regenerar plantas fértiles en forma masiva *in vitro* a partir de células de una planta seleccionada. Además, cuando ya se cuenta con células cultivadas *in vitro* de la especie de interés, es factible aplicar en estas células técnicas de ingeniería genética. Con ello se han generado plantas modificadas a partir de células cultivadas *in vitro* que han recibido y codificado genes de especies diferentes (Jordán y Casareto, 2006).

2.6.1 Requisitos para realizar cultivo de células, tejidos y órganos vegetales.

Para lograr el mantenimiento de células viables que han sido separadas del resto de una planta se requiere proporcionarles un ambiente aséptico (libre de microorganismos); la composición de medio de cultivo que contenga todas las sustancias en las cantidades

apropiadas para lograr la proliferación celular, o en su caso para inducir la morfogénesis y regeneración de la planta completa; el ambiente físico de incubación que incluye, la temperatura en rango de 15 a 27 °C, y la iluminación en calidad, intensidad y duración.

Componentes de medio de cultivo. Los grupos de componentes de medio de cultivo son: 1) agua; 2) sales minerales (macro y micronutrientes); 3) compuestos orgánicos (carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, reguladores del crecimiento, complejos orgánicos); 4) sustancias de soporte físico.

2.7 Reguladores de crecimiento

La presencia de hormonas en diferentes niveles en las plantas y sus células, permite que éstas desarrollen caminos morfogénicos alternos muy distintos, los cuales pueden darse todos de acuerdo al grado de ontogenia. Lo más general es que las células en crecimiento por acción de varias hormonas expresen división y elongación celular; sin embargo, y especialmente bajo condiciones *in vitro*, se ha observado que tales células inician procesos de diferenciación bajo ciertos niveles hormonales (Jordán y Casareto, 2006).

2.7.1 Auxinas

Uno de los ensayos más antiguos sobre crecimiento vegetal implicó estudios sobre la biología y mecanismos de acción de las auxinas, las primeras hormonas vegetales en ser descubiertas (Jordán y Casareto, 2006). Las auxinas son un grupo de hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas.

La forma predominante en las plantas es el ácido indolacético (IAA), muy activo en bioensayos y presente comúnmente en concentraciones nanomolares. Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4 cloro-indolacético (4-Cl-IAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (IPA) (Ludwig y Cohen, 2002).

Las auxinas generalmente inducen: elongación celular y expansión de los tejidos, división celular (formación de callo), y formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicios, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. Con una baja concentración de auxina predomina la formación de raíces mientras con altas concentraciones de auxina no se produce raíces, y tiene lugar, en cambio, la formación de callo (Pierik, 1990b).

2.7.2 Citocininas

Son un grupo más reducido de hormonas que deben su nombre a su función (citoquinesis). En conjunto con las auxinas estimulan la división celular. Derivan de adeninas, y las más frecuentes son la kinétina y bencilaminopurina que son sintéticas y la zeatina es natural (Peter *et al.*, 1992). Inducen procesos de división celular, entre estos se encuentran la formación y crecimientos de brotes axilares, germinación de semillas, la maduración de cloroplastos, la diferenciación celular, además del control de varios procesos vegetales como el retardo de la senescencia y la transducción de señales.

Efectos característicos: en los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citocininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además, se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares para la ruptura

de la dominancia apical. Las citocininas generalmente son diluidas con hidróxido de sodio 1N (Cabrera *et al.*, 2003).

2.8 Organogénesis

La organogénesis hace referencia a la capacidad de las células vegetales que se encuentran en el explante para reprogramar su desarrollo hacia la formación de tejidos y órganos nuevos que constituyen una planta tales como raíces y tallos. Consiste en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema y el desarrollo de ese primordio en brotes vegetativos que luego enraizan vía la formación y proliferación de meristemas radicales. Los brotes pueden formarse directamente del explanto (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (Howell *et al.* 2003), que permitirán el desarrollo de meristemas, yemas y brotes adventicios hasta la obtención de una plántula completa.

La organogénesis se índice al establecer el tejido somático, que podría contener un meristemo (yemas axilares o adventicias) en un medio suplementado con niveles óptimos de sales, de compuestos orgánicos y de reguladores de crecimiento. En este proceso la mitosis es esencial ya que permite la formación de un número crítico de células en división activa, que son capaces de responder a señales de desarrollo, este grupo de células en división activa son llamadas meristemoides, de forma isodiametrica, con un citoplasma denso, vacuolas pequeñas y núcleos prominentes, que contiene varios orgánulos y grandes cantidades de almidón las cuales se necesitan en cantidades considerables durante su diferenciación (Mathur y Koncz, 2005). La calidad y cantidad de los componentes del medio dependerá de la especie y del explanto que se quiera cultivar *in*

vitro dado que la inducción de un tipo específico de órgano involucra estimular la expresión de genes específicos.

CAPITULO III.

SALES MINERALES Y CITOCININAS EN LA PROPAGACIÓN *in vitro* DE DOS PROCEDENCIAS DE *Agave potatorum* Zucc.

[MINERAL SALTS AND CYTOKININES IN THE *in vitro* PROPAGATION OF TWO PROVENENCES OF *Agave potatorum* Zucc.]

Ariadna Ivon Bautista-Castellanos^{1§}, José Raymundo Enríquez-del Valle², Vicente Arturo Velasco-Velasco² y Gerardo Rodríguez-Ortiz², Víctor Arturo González-Hernández³

¹Estudiante de Maestría en Ciencias en Productividad en Agroecosistemas del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca (ITVO). ²Profesor Investigador (ITVO). Ex-Hacienda de Nazareno Xoxocotlán, Oaxaca, México. C. P. 71230. Tel: (01951) 5170788, 5170444. §Autor responsable: (baus.caste@gmail.com)

³Profesor Investigador del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, km 32.5 Carretera México- Texcoco, Estado de México, C.P. 56230, Tel: 015558045942

RESUMEN

Agave potatorum tiene alto potencial de uso como fuente de materia prima para la elaboración de la bebida alcohólica denominada mezcal. En los trabajos de propagación *in vitro* de agaves no se ha evaluado la respuesta de proliferación de brotes en función de genotipo. Bajo este contexto, el objetivo del presente trabajo fue, evaluar la multiplicación de brotes de dos procedencias de A.

potatorum que se establecieron en medios de cultivos que variaron en composición de sales minerales y concentración de citocininas. Los medios de cultivo contenían las sales minerales MS con concentraciones diferentes (75 y 100%), 0, 1, 2 y 3 mg L⁻¹ de la citocinina N6-bencilaminopurina (BAP), así como 0, 1 y 2 mg L⁻¹ de la citocinina 6-furfurilaminopurina, kinetina. Cuando transcurrieron 60 días de incubación, los brotes de la procedencia Sola de Vega y los brotes de San Pedro Totolapan tuvieron en promedio 3.30 cm y 2.81 cm en altura, respectivamente; 4.45 y 3.91 hojas; el brote mayor fue de 1.43 y 0.95 cm. Los cultivos formaron en promedio 15.3 y 16.0 brotes, en medios de cultivo con 3 mg L⁻¹ de BAP, 0 y 2 mg L⁻¹ de KIN con las sales minerales al 75%.

Palabras clave: *Agave potatorum* Zucc., bencilaminopurina, kinetina, multiplicación de brotes, procedencias.

ABSTRACT

Agave potatorum has a high potential for use as a source of raw material for the production of the alcoholic beverage called mezcal. When agave species are propagated by *in vitro* culture, the shoot proliferation response according to genotype has not been evaluated. In this context, the aim of the present work was to evaluate the shoots multiplication of two provenances of *A. potatorum* that were established in culture media that varied in mineral salt composition and cytokinin concentration. The culture media contained the MS mineral salts at different concentrations (75 and 100%), 0, 1, 2 and 3 mg L⁻¹ of the cytokinin N6-benzylaminopurine (BAP), as well as 0, 1 and 2 mg L⁻¹ of the cytokinin 6-furfurylaminopurine, kinetin. When 60 days of incubation elapsed, the shoots of the Sola de Vega and San Pedro Totolapan averaged 3.30 cm and 2.81 cm in height, respectively; 4.45 and 3.91 leaves; the largest shoot was 1.43 and 0.95 cm. The cultures formed on

average 15.3 and 16.0 shoots, in culture media with 3 mg L⁻¹ of BAP, 0 and 2 mg L⁻¹ of KIN with 75% mineral salts.

Key words: *Agave potatorum* Zucc., benzylaminopurine, kinetin, shoot multiplication, provenances.

3.1 INTRODUCCIÓN

En el suroeste de México, se practica el aprovechamiento intensivo no planificado de poblaciones silvestres de agaves, entre ellos *A. potatorum*, lo que ha provocado la notable disminución de sus poblaciones, aunque no documentada. El tallo (piña) de esta especie se usa como materia prima para la elaboración de la bebida alcohólica denominada mezcal (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013), que se distingue por su elevada proporción de carbohidratos y compuestos aromáticos volátiles, que en un proceso de elaboración artesanal confieren a la bebida calidad y propiedades organolépticas particulares apreciadas por los consumidores (Molina-Guerrero *et al.*, 2007).

Debido a la notable disminución de las poblaciones silvestres y la consecuente escasez de materia prima, desde mediados de los años 1990's grupos de agricultores de maguey en la Sierra Sur de Oaxaca están implementando acciones de propagación de *A. potatorum* mediante semillas y han logrado establecer pequeñas plantaciones. En adición se ha usado la propagación *in vitro* de esta especie (Enríquez-del Valle *et al.*, 2016a), la aclimatación en invernadero y desarrollo en vivero de las plantas micropropagadas (Enríquez-del Valle *et al.* 2016b) como procedimientos de una alternativa complementaria y no excluyente a la propagación convencional (Enríquez-del Valle, 2008) para producir cantidad suficiente de plantas con las características genotípicas del material inicial seleccionado, lo que también contribuiría a la preservación e incremento de poblaciones de especies silvestres (Pedrosa-Manrique y Tupaz-Villacorte, 2008).

Cuando se dispone de un protocolo de micropropagación de una especie y de una reserva de cultivos *in vitro* en etapa de multiplicación de propágulos, es posible implementar la propagación de gran cantidad de plantas en un periodo corto sin importar las estaciones del año (Enríquez-del Valle, 2008). La micropropagación puede iniciar a partir de yemas axilares y apicales, que al ser establecidas en medio de cultivo de composición definida y ambiente de incubación, se estimula el desarrollo de brotes múltiples en los que se induce división celular y organogénesis de *novo*; este resultado también se podría lograr a partir de otros tejido somáticos usados como explantes, como tallo y hoja.

Los reguladores de crecimiento de tipo citocininas, son esenciales en los medios de cultivo *in vitro*, porque promueven en el explante la división celular y la formación de centros meristemáticos que darían origen a nuevos brotes. La organogénesis *in vitro* se basa en la llamada totipotencialidad celular, puesto que cada célula somática posee el genoma completo en el que es posible inducir la regeneración de una planta completa (Domínguez-Rosales, 2009). Esto se ha demostrado en trabajos de investigación desarrolladas para diversas especies del género *Agave*: *A. sisalana* (Hazra, *et al.* 2002.) *A. angustifolia* (Enríquez del Valle, 2008; Ríos-Ramírez *et al.*, 2018) y *A. tequilana* (Valenzuela-Sánchez *et al.* 2006). En *A. angustifolia* (Enríquez-del Valle *et al.*, 2005) y en *A. americana* (Miguel-Luna *et al.*, 2014) se demostró que la concentración de sales minerales y reguladores de crecimiento tienen efecto en el nivel de organogénesis de los tejidos somáticos.

En agaves no se ha evaluado la respuesta de proliferación de brotes en función de genotipos de distintas procedencias. En *Pinus caribaea* var. *caribaea* García-Quintana *et al.* (2007) demostraron encontrar diferencias significativas entre procedencias, para la proliferación de brotes, lo cual es una expresión de las diferencias genotípicas entre los individuos. Orellana-Pérez *et al.* (2002) menciona que la respuesta genotípica depende de la expresión génica de cada individuo, la cual

depende del medio ambiente donde éste se desarrolla. En *Psidium guajava* L. (Domínguez-Perales *et al.*, 2016), *Solanum* (Botero-Giraldo *et al.* 2011), *Cucurbita pepo* L. (Sánchez-Hernández *et al.*, 2009), se ha demostrado que existen diferencias entre genotipos en la cantidad de brotes que desarrollan, en condiciones similares de cultivo *in vitro*. Bajo este contexto, el objetivo del presente trabajo fue, evaluar la multiplicación de brotes de dos procedencias geográficas de *Agave potatorum* Zucc., al ser establecidas en medios de cultivos con diferente composición de sales minerales y concentración de citocininas.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Obtención del material vegetativo

La investigación se hizo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, México, ubicado en 17°04' N, 96°46' O y 1550 msnm. El material vegetativo se obtuvo a partir de semillas de *Agave potatorum*, colectadas de plantas en San Pedro Totolapan, Distrito de Tlacolula, Oaxaca (16°40' N y 96°18' O, 940 msnm), y de plantas de 156 a 188 cm de diámetro y de 110 a 125 cm de altura de roseta localizadas en Sola de Vega, Sierra Sur, Oaxaca (16°30' N y 97°59' O, 1,440 msnm) en terreno con 30% de pendiente. La distancia aproximada entre ambos sitios de colecta es de 187 km.

Para lograr su germinación *in vitro* las semillas fueron sometidas a esterilización superficial que consistió de una secuencia de: lavado en solución 0.5% detergente en polvo durante 10 min; inmersión en solución 0.6% de hipoclorito de sodio por 20 min y finalmente, bajo condiciones de asepsia proporcionadas por una cámara de flujo laminar horizontal (Forma Scientific brand, model 1839, Houston, TX, USA), las semillas se enjuagaron con agua esterilizada. El medio de cultivo para germinar las semillas se preparó con las sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962) a

50 % de concentración, pH ajustado a 5.8, y solidificado con 5.7 g L^{-1} de agar. Se colocaron tapas de polipropileno a los frascos y se esterilizaron en autoclave durante 17 min a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1.2 kg cm^{-2} de presión.

Se pusieron cinco semillas en cada frasco de 145 cm^3 que contenía 20 mL de medio del cultivo esterilizado y consistencia de gel. Los frascos se sellaron con polietileno adherente, y se colocaron en el área de incubación en donde estuvieron expuestas a iluminación LED de $35 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, aplicada en fotoperiodos de 16 (día)/ 8 (noche) h; la temperatura osciló de 15 a $28 \text{ }^\circ\text{C}$. Transcurridos 25 días se tuvieron plántulas de 2 a 3.5 cm de altura, que se extrajeron del medio de germinación, se colocaron en caja Petri de vidrio esterilizada y se cortaron en fragmentos quitando hojas y raíces; la porción del tallo con el ápice meristemático se colocó en frascos que contenían 20 mL de medio de cultivo esterilizado y consistencia de gel, para inducir la formación de brotes adventicios. Tal medio fue preparado con las sales inorgánicas MS, 25 g L^{-1} de sacarosa, 0.1 mg L^{-1} de ácido indolacético, 1 mg L^{-1} tiamina-HCl, 100 mg L^{-1} myo-inositol, 1 mg L^{-1} de N6-Bencilaminopurina, pH 5.8 y 5.7 g L^{-1} de agar.

Se colocaron dos segmentos de tallo (explantes), en cada frasco de cultivo, que luego se taparon y sellaron con polietileno adherente, para enseguida colocarlos en el área de incubación durante 70 días en las condiciones descritas para la etapa de germinación de semillas. Transcurrido ese tiempo se tuvieron racimos de 15 a 23 brotes adventicios en cada explante. Para incrementar la cantidad de brotes y obtener los suficientes para el experimento, cada racimo de brotes se separó en mini-racimos con dos a tres brotes que se subcultivaron a otros frascos que contenían medio de cultivo de composición similar, y se incubaron en las condiciones de temperatura e iluminación ya descritas para inducir la formación de brotes adventicios. Los subcultivos se hicieron cada cinco semanas.

3.2.2 Multiplicación de brotes

De los racimos de 15 a 23 brotes en una base común de callo que se formaron en cada cultivo *in vitro*, se separaron en mini-racimos de dos a tres brotes en una base común de callo, para establecerlos en frascos de 145 cm³ con 20 mL de alguna de 24 variantes de medio de cultivo, preparada con: 1) 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.5 mg L⁻¹ de ácido indolacético; 2) Dos concentraciones (75 y 100 %) de las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962); 3) Cuatro concentraciones (0, 1, 2 y 3 mg L⁻¹) de la citocinina N6-bencilaminopurina (BAP); y 4) Tres concentraciones diferentes (0, 1 y 2 mg L⁻¹) de la citocinina 6-furfurilaminopurina, kinetina, En todas las variantes el pH se ajustó a 5.8 y se agregó 5.7 g L⁻¹ de agar. En cada frasco con alguna variante de medio de cultivo se estableció un explanto de una procedencia de *Agave potatorum*. Los cultivos se incubaron por 60 días en condiciones de iluminación LED blanca en fotoperiodos de 16/8 h, y temperatura que fluctuó en el rango de 15 a 28 °C.

3.2.3 Análisis estadísticos

El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente al azar con arreglo de tratamientos factorial 2 x 4 x 3 x 2 (dos concentraciones de sales minerales; cuatro concentraciones de BAP; tres concentraciones de kinetina; dos procedencias, San Pedro Totolapan y Sola de Vega), para un total de 48 tratamientos (Cuadro 1). La unidad experimental fue un mini-racimo de brotes en un frasco de cultivo, y se tuvieron ocho repeticiones por tratamiento, lo que dio un total de 384 unidades experimentales. Transcurridos 15 días y posteriormente a los 60 días del experimento, en cada unidad experimental se registraron las variables: número de brotes, número de hojas, longitud de la hoja más larga, tamaño del brote mayor y número de raíces. Los datos de cada fecha y variable

se sometieron a análisis de varianza y comparaciones de medias (Tukey, 0.05). Para las rutinas de análisis estadístico se usó el programa computacional Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

Cuadro 1. Composición de los 48 tratamientos del experimento

| TRAT | | SM | BAP mg L ⁻¹ | KIN mg L ⁻¹ | TRAT | | SM | BAP mg L ⁻¹ | KIN mg L ⁻¹ |
|------|----|------|---------------------------|---------------------------|------|----|-----|---------------------------|---------------------------|
| SPT | SV | | | | SPT | SV | | | |
| 1 | 25 | 100% | 0 | 0 | 13 | 37 | 75% | 0 | 0 |
| 2 | 26 | 100% | 0 | 1 | 14 | 38 | 75% | 0 | 1 |
| 3 | 27 | 100% | 0 | 2 | 15 | 39 | 75% | 0 | 2 |
| 4 | 28 | 100% | 1 | 0 | 16 | 40 | 75% | 1 | 0 |
| 5 | 29 | 100% | 1 | 1 | 17 | 41 | 75% | 1 | 1 |
| 6 | 30 | 100% | 1 | 2 | 18 | 42 | 75% | 1 | 2 |
| 7 | 31 | 100% | 2 | 0 | 19 | 43 | 75% | 2 | 0 |
| 8 | 32 | 100% | 2 | 1 | 20 | 44 | 75% | 2 | 1 |
| 9 | 33 | 100% | 2 | 2 | 21 | 45 | 75% | 2 | 2 |
| 10 | 34 | 100% | 3 | 0 | 22 | 46 | 75% | 3 | 0 |
| 11 | 35 | 100% | 3 | 1 | 23 | 47 | 75% | 3 | 1 |
| 12 | 36 | 100% | 3 | 2 | 24 | 48 | 75% | 3 | 2 |

TRAT= tratamiento; SPT= San Pedro Totolapan; SV= Sola de Vega; SM= sales minerales; BAP= bencilaminopurina; KIN= kinetina.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró la proliferación *in vitro* de brotes de *A. potatozum*, en las dos procedencias estudiadas (Figura 6), y con diferencias entre las concentraciones de sales minerales y de citocininas en cuanto a la cantidad de brotes, el tamaño de éstos y en la formación de raíces. Desde la primera fecha de registro de datos a los 15 días ya se detectaban diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los niveles de concentración de BAP en el medio de cultivo en cuanto longitud de la hoja más larga (LHP), número de hojas (NHP), número de brotes (NBP).



Figura 6. Formación de brotes: A) procedencia de San Pedro Totolapan a los 15 y 60 días del experimento. B) procedencia de Sola de Vega a los 15 y 60 días.

A los 60 días los efectos de las distintas concentraciones de las citocininas, y de las sales minerales se observaron de manera más marcada (Cuadro 2). Los análisis de varianza mostraron que a los 60 días las procedencias (PROCE) tuvieron efectos diferentes altamente significativos ($p \leq 0.01$) en número de hojas, altura de la planta, tamaño del brote mayor y en número de raíces. Las concentraciones de N6-Bencilaminopurina (BAP) en el medio de cultivo tuvieron efectos altamente significativos ($p \leq 0.01$) en número de hojas, altura de la planta, número de brotes y en número de raíces. Las concentraciones de Kinetina (KIN) tuvieron efectos diferentes significativos ($p > 0.05$) en el número de hojas y efectos altamente significativos ($p \leq 0.01$) en el número de raíces. Las concentraciones de sales minerales (SM) tuvieron efectos diferentes altamente significativos ($p \leq 0.01$) en la altura de la planta, efectos diferentes significativos ($p > 0.05$) en número de hojas,

en el tamaño del brote mayor y en el número de raíces. La interacción de BAP×SM tuvo efectos altamente significativos ($p \leq 0.01$) en número de raíces y efectos significativos ($p > 0.05$) en número de hojas. La interacción KIN×SM no fue significativa en cualquier variable. La interacción BAP×KIN tuvo efectos altamente significativos ($p \leq 0.01$) en el número de raíces y efectos significativos ($p > 0.05$) en el número de hojas. La triple interacción de BAP×KIN×SM no fue significativa en cualquier variable. La interacción PROCE×BAP tuvo efectos altamente significativos ($p \leq 0.01$) en tamaño del brote mayor y en el número de raíces, así como efectos significativos ($p > 0.05$) en el número de brotes. La interacción PROCE×KIN tuvo efectos significativos ($p > 0.05$) en el tamaño del brote mayor. La interacción PROCE×SM tuvo efectos significativos ($p > 0.05$) en el número de hojas. Las triples interacciones PROCE×BAP×KIN y PROCE×KIN×SM no tuvieron efectos en cualquier variable. La cuarta interacción PROCE×BAP×KIN×SM tuvo efectos significativos ($p > 0.05$) en el número de brotes.

Cuadro 2. Resumen del análisis de varianza de diversas variables de *Agave potatorum* Zucc., de dos procedencias, cultivados *in vitro* en medios de cultivo que variaron en concentraciones de citocininas y sales minerales.

| Cuadrados Medios y Significancia | | | | | | |
|----------------------------------|-----|----------|---------|--------|---------|----------|
| F.V | GL | LHP | LHS | NHP | NHS | NBP |
| Trat. | 47 | 0.23** | 0.85** | 0.81** | 1.95** | 92.92** |
| PROCE | 1 | 0.003* | 22.76** | 6.64** | 28.16** | 2043.7** |
| BAP | 3 | 0.64* | 1.18** | 2.86** | 5.82** | 270.40** |
| KIN | 2 | 0.08ns | 0.23ns | 0.37ns | 1.67* | 6.02ns |
| SM | 1 | 5.06** | 8.07** | 0.81ns | 3.11* | 396.7** |
| BAP*SM | 3 | 0.16ns | 0.31ns | 0.18ns | 1.16* | 17.95ns |
| KIN*SM | 2 | 0.0091ns | 0.005ns | 0.45ns | 0.97ns | 20.90ns |
| BAP*KIN | 6 | 0.20ns | 0.16ns | 0.77* | 1.58* | 19.75ns |
| BAP*KIN*SM | 6 | 0.081ns | 0.09ns | 0.60ns | 0.39ns | 18.52ns |
| PROCE*BAP | 3 | 0.13ns | 0.12ns | 0.83ns | 0.87ns | 87.31* |
| PROCE*KIN | 2 | 0.05ns | 0.13ns | 0.41ns | 0.71ns | 10.51ns |
| PROCE*SM | 1 | 0.0002ns | 0.06ns | 0.62ns | 6.20* | 43.40ns |
| PROCE*BAP*KIN | 6 | 0.06ns | 0.15ns | 0.99* | 0.59ns | 14.29ns |
| PROCE*KIN*SM | 2 | 0.14ns | 0.15ns | 0.01ns | 0.74ns | 4.90ns |
| PROCE*BAP*KIN*SM | 9 | 0.05ns | 0.11ns | 0.19ns | 0.80ns | 39.58* |
| Error | 336 | 0.102 | 0.13 | 0.35 | 0.425 | 15.36 |

| Total | 383 | | | | |
|---|-----|----------|---------|----------|---------|
| Cuadrados Medios y Significancia | | | | | |
| F.V | GL | NBS | TBM | NRP | NRS |
| Trat. | 47 | 91.47** | 1.035** | 1.57** | 9.17** |
| PROCE | 1 | 36.506ns | 22.54** | 3.84** | 4.27* |
| BAP | 3 | 771.49** | 0.44ns | 5.04** | 83.22** |
| KIN | 2 | 37.650ns | 0.36ns | 3.08** | 14.51** |
| SM | 1 | 358.44* | 3.44* | 0.07ns | 5.82* |
| BAP*SM | 3 | 65.836ns | 0.27ns | 0.09ns | 2.51* |
| KIN*SM | 2 | 45.204ns | 0.31ns | 0.13ns | 1.25ns |
| BAP*KIN | 6 | 33.268ns | 0.05ns | 3.06** | 11.95** |
| BAP*KIN*SM | 6 | 32.952ns | 0.72ns | 0.08ns | 1.13ns |
| PROCED*BAP | 3 | 68.676* | 2.06** | 3.71** | 11.77** |
| PROCED*KIN | 2 | 5.632ns | 1.19* | 2.11** | 0.80ns |
| PROCED*SM | 1 | 14.337ns | 0.05ns | 0.0004ns | 3.35* |
| PROCED*BAP*KIN | 6 | 9.963ns | 0.32ns | 2.28** | 0.96ns |
| PROCED*KIN*SM | 2 | 23.577ns | 0.38ns | 0.02ns | 0.27ns |
| PROCED*BAP*KIN*SM | 9 | 54.504* | 0.34ns | 0.01ns | 0.80ns |
| Error | 336 | 25.75 | 0.392 | 0.15 | 0.44 |
| Total | 383 | | | | |

FV= fuentes de variación; GL= grados de libertad; PROCE= procedencias; BAP= bencilaminopurina; KIN= kinetina; SM= sales minerales LHP=Longitud de la hoja más larga primera medición, LHS= longitud de la hoja más larga 60 días, NHP=Número de hojas primera medición, NHS=Número de hojas en 60 días, NBP=Número de brotes primera medición, NBS= Número de brotes en 60 días, TBM= tamaño del brote mayor en 60 días, NRP=Número de Raíz primera medición, NRS=Número de Raíz en 60 días; * = significativo ($p > 0.05$); ** = altamente significativo ($p \leq 0.01$).

Al analizar los datos en función de las procedencias (cuadro 3) los brotes de agaves de la procedencia de Sola de Vega, mostraron mayor crecimiento que los brotes de la procedencia de San Pedro Totolapan, ya que a los 60 días tuvieron en promedio 3.30 cm y 2.81 cm de altura; 4.45 y 3.91 hojas; el brote mayor fue de 1.43 y 0.95 cm, magnitudes que en cada caso fueron significativamente diferentes (Tukey 0.05). Las procedencias de San Pedro Totolapan y Sola de Vega formaron en promedio 16.0 y 15.3 brotes, cantidades que, no fueron significativamente diferentes (Tukey 0.05). Los agaves de San Pedro Totolapan, formaron en promedio 0.69 raíces, cantidad significativamente (Tukey 0.05) mayor a las 0.48 raíces que formaron los brotes de la procedencia de Sola de Vega. Las diversas concentraciones de BAP estimularon la formación y crecimiento de brotes en nivel diferente a los cultivos de las dos procedencias, que se podrían atribuir a genotipos. Ocampo y Manuel (2007) en su investigación con *Psidium guajaba*, indican

que genotipos produjeron diferentes cantidades de brotes y de nudos en los tallos, comparados en condiciones similares de cultivo *in vitro*.

Al ordenar los datos en función de las concentraciones de la BAP, cuando transcurrieron 60 días de incubación, en los cultivos se formó mayor cantidad de brotes en relación positiva con la concentración de esta citocinina en el medio de cultivo, de tal manera que los propágulos en los medios de cultivo sin de BAP (0 mg L^{-1}) y en los medios con 3 mg L^{-1} de BAP tuvieron 12.16 y 18.72 brotes, significativamente diferentes (Tukey 0.05), así también, los brotes en el medio de cultivo sin BAP formaron en promedio 1.97 raíces, y la adición de BAP tuvo efecto inhibitorio en la formación de raíces, cada vez más marcada en relación a la concentración de esta citocinina. La proliferación de brotes de la procedencia de San Pedro Totolapan fue mayor en el medio de cultivo con 3 mg L^{-1} de BAP, 0 mg L^{-1} de KIN y sales minerales al 75%, mientras que los cultivos de la procedencia de Sola de Vega, en medio de cultivo con 3 mg L^{-1} de BAP, 2 mg L^{-1} de KIN y con sales minerales al 75%, los que formaron en promedio 23.30 y 20.68 brotes respectivamente. Los resultados indican que esta especie es estimulada a formar más brotes, al someterla a mayor concentración de BAP, resultados que coinciden con Domínguez-Rosales *et. al* (2008) al mencionar que en agaves la BAP es la citocinina que mejor induce la formación de brotes. Así mismo para Ruvalcaba-Ruiz *et. al* (2010) las altas concentraciones de BAP y bajas o ninguna concentración de ANA promueven el desarrollo de numerosos brotes en diferentes especies de cactáceas. Aguilar-Jiménez y Rodríguez-de la O (2018) en *A. marmorata* reportan que AIA y BAP en igual concentración favorecieron la multiplicación de brotes, pero cuando las concentraciones de BAP son mayores de 3 mg L^{-1} , con o sin AIA se inhibe la formación de brotes, resultados que difieren con los obtenidos en el presente trabajo con *Agave potatorum* ya que la concentración de AIA no fue la misma.

Cuadro 3. Características de propágulos de *Agave potatorum* Zucc., cultivados *in vitro* en función de niveles de factores principales.

| CARACTERÍSTICAS | | | | | | |
|-----------------|-------------|------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| Factores | LHP (cm) | LHS (cm) | NHP | NHS | NBP | NBS |
| PROCE | | | | | | |
| SPT | 2.55±0.32 a | 2.81±0.36b | 3.60±0.74a | 3.91±0.76b | 11.95±4.65a | 16.00±5.88a |
| SV | 2.55±0.36a | 3.30±0.44a | 3.34±0.49b | 4.45±0.70a | 7.33±4.18b | 15.3 ± 5.73a |
| BA | | | | | | |
| 0 | 2.64 ±0.35a | 3.17±0.42a | 3.72±0.72a | 4.55±0.88a | 7.57±3.41c | 12.16±3.71c |
| 1 | 2.45 ±0.31b | 2.90±0.45b | 3.33±0.57b | 4.01±0.71b | 9.168±4.03b | 14.86±4.79b |
| 2 | 2.53±0.36ab | 3.06±0.50a | 3.40±0.63b | 4.09±0.75b | 10.33±4.95ab | 17.04±5.59a |
| 3 | 2.57±0.31a | 3.07±0.47a | 3.44±0.57b | 4.08±0.66b | 11.50±6.26a | 18.72±6.62a |
| KIN | | | | | | |
| 0 | 2.52±0.33a | 3.02±0.45a | 3.48±0.69a | 4.27±0.84a | 9.39±4.84a | 15.24±5.69a |
| 1 | 2.57±0.32a | 3.10±0.48a | 3.52±0.62a | 4.22±0.72ab | 9.80±4.92a | 16.30±5.83a |
| 2 | 2.55±0.36a | 3.03±0.48a | 3.41±0.60a | 4.05±0.76b | 9.72±5.22a | 15.54±5.91a |
| SM | | | | | | |
| 75 | 2.66±0.34a | 3.20±0.48a | 3.43±0.63a | 4.09±0.77b | 10.66±5.51a | 16.66±6.13a |
| 100 | 2.43±0.30b | 2.91±0.41b | 3.52±0.64a | 4.27±0.78a | 8.62±4.16b | 14.73±5.32b |
| Factores | TMB (cm) | NRP | NRS | | | |
| PROCED | | | | | | |
| 1 | 0.94±0.55b | 0.21±0.79a | 0.69±1.53a | | | |
| 2 | 1.43±0.72a | 0.01±0.10b | 0.48±0.92b | | | |
| BA | | | | | | |
| 0 | 1.09±0.78a | 0.46±1.07a | 1.97±1.73a | | | |
| 1 | 1.21±0.97a | 0.01±0.10b | 0.29±0.83b | | | |
| 2 | 1.20±0.39a | 0±0b | 0.08±0.38bc | | | |
| 3 | 1.24±0.41a | 0.00±0.05b | 0.00±0.05c | | | |
| KIN | | | | | | |
| 0 | 1.18±0.72a | 0.29±0.92a | 0.97±1.75a | | | |
| 1 | 1.13±0.37a | 0.01±0.08b | 0.35±0.83b | | | |
| 2 | 1.24±0.86a | 0.04±0.27b | 0.43±0.91b | | | |
| SM | | | | | | |
| 75 | 1.28±0.40a | 0.13±0.66a | 0.71±1.40a | | | |
| 100 | 1.09±0.87b | 0.10±0.46a | 0.46±1.11b | | | |

PROCE= procedencias; SPT= San Pedro Totolapan; SV= Sola de Vega; BAP= bencilaminopurina; KIN= kinetina; SM= sales minerales AP=Altura de la planta primera medición, APS= Altura de la hoja en 60 días, NHP=Número de hojas primera medición, NHS=Número de hojas en 60 días, NBP=Número de brotes primera medición, NBS= Número de brotes en 60 días, TBM= tamaño del brote mayor; NRP=Número de Raíz primera medición, NRS=Número de Raíz en 60 días. Medias con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

Los agaves de ambas procedencias formaron raíces cuando se les estableció en medios de cultivo sin citocininas y con sales minerales al 75%, esto coincide con Salazar *et. al* (2009) quien menciona que brotes de *A. cocui* establecidos en medio de cultivo sin citocininas formaron raíces, y Enríquez-

del Valle *et al.* (2005) evidenciaron que brotes de *Agave angustifolia* formaron más raíces adventicias cuando que se establecieron en medio de cultivo con las sales minerales disminuidas a 75%.

Al ordenar los datos en función de los niveles de Kinetina no se observaron efectos sobre la mayoría de las variables, pero la presencia de esta citocinina en el medio de cultivo inhibió la formación de raíces en los brotes. Lee-Espinosa *et. al* (2007) con *Laelia anceps* ssp. *dawsonii* indica que al utilizar las citocininas BAP y KIN en combinación con una sola auxina (ANA), provocó una marcada disminución del índice de multiplicación y la morfogénesis en los callos; así mismo Martínez-Villegas *et. al* (2011) describieron que brotes de pitayo (*Stenocereus stellatus*), establecidos en medios de cultivo con 2.2 y 4.4 μm de kinetina y 2.2 μm de 2-ip, formaron menos brotes en sus explantes en comparación a explantes en medios de cultivos con 17.6 y 35.2 μm de kinetina y 4.4, 8.8 y 17.6 μm de 2-iP.

Al ordenar los datos en función de la concentración de las Sales minerales, se observa que los propágulos en el medio de cultivo con las sales minerales al 75% y los propágulos en los medios con las sales minerales al 100% de concentración tuvieron 16.6 y 14.73 brotes, el brote mayor de 1.28 y 1.09 cm; sus hojas de 3.20 y 2.91 cm de longitud, y formaron 0.71 y 0.46 raíces, magnitudes que en cada caso fueron significativamente diferentes (Tukey 0.05). La cantidad de sales minerales y de otras sustancias disueltas en el medio de cultivo tiene efecto en modificar el potencial osmótico, PO, del medio, que a su vez afecta la organogénesis. De acuerdo a Cárdenas y Villegas (2002) un medio de cultivo con las sales minerales MS a 100% de concentración tiene -0.23 MPa de PO, y la sacarosa a 3% crea un PO de -0.45 MPa. Entonces los medios de cultivo con 100% o 75% de sales minerales MS y 3% de sacarosa tendrían -0.68 y -0.6225 MPa de PO.

En el presente trabajo, el medio de cultivo con 75% sales minerales fue mejor condición que el medio de cultivo con 100% de sales inorgánicas, para que en los propágulos de *A. potatorum* se formara mayor cantidad de brotes y su crecimiento, evaluado la longitud de la hoja más larga, tamaño del brote mayor y cantidad de raíces. Los cultivos de la procedencia de San Pedro Totolapan en el medio de cultivo con sales minerales al 100% desarrollaron brotes de tamaño mayor, mientras que la procedencia de Sola de Vega, la mejor respuesta ocurrió en el tratamiento 30 (1 mg L⁻¹ BA, 2 mg L⁻¹ KIN, SM 100%).

3.4 CONCLUSIONES

Es importante la generación de protocolos para cada genotipo de agave, pero los niveles de respuesta dependieron de las procedencias que respondieron en diferente grado a la concentración de las citocininas y de las sales minerales. Los cultivos de San Pedro Totolapan y los cultivos de Sola de Vega formaron 16 y 15.3 brotes, estadísticamente no diferentes. Pero la procedencia de Sola de Vega formó brotes de 1.43 cm, con 4.45 hojas, magnitudes mayores a los 0.94 cm de altura y 3.91 hojas que tuvieron los cultivos de la procedencia de San Pedro Totolapan. Los cultivos formaron más brotes al disminuir a 75% la concentración de sales minerales MS y conforme se incrementó la concentración de Bencilaminopurina hasta 3 mg L⁻¹. La kinetina fue de efecto leve en la mayoría de las variables evaluadas.

3.5 LITERATURA CITADA

- Aguilar-Jiménez, D. y J. L. Rodríguez-de la O. 2018. Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roetzl) en la Mixteca Poblana. Revista Colombiana Biotecnología. Vol. XX No 2. 124-131. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084.
- Aguirre-Dugua, X. y L. E. Eguiarte. 2013. Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in México. Journal of Arid Environments (90): 36-44.

- Botero-Giraldo, C. C, Restrepo-Osorio y A. I., Urrea-Trujillo. 2011. Respuesta de tres genotipos de tomate al cultivo *in vitro* y aislamiento de protoplastos. *Actualidades Biológicas* 33 (94): 35-49.
- Cárdenas-Lara, Ma. A y A. Villegas-Monter. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Rev. Fitotecnia Mexicana* 25 (2): 213-217.
- Domínguez-Perales, L. A., J. L. Domínguez-Álvarez, S., Cruz-Izquierdo, A. Santacruz-Varela, A. Barrientos-Priego, J. Padilla-Ramírez y M. A. Gutiérrez-Espinosa 2016. Propagación *in vitro* de selecciones de Guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana* 39 (3): 285-295.
- Domínguez-Rosales, M. S. 2009. Desarrollo de herramientas biotecnológicas para la propagación masiva y mejoramiento de especies del género *Agave*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Ags. 111 p.
- Domínguez-Rosales, M. S., Alpuche-Solís, A. G. Velasco-Méndez, N. L y E. P. Molphe-Bach. 2008. Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Vol. 31. Núm. 4. 317-322.
- Enríquez-del Valle J. R., K.H. Antonio-Luis, G. Rodríguez- Ortiz, and G. V. Campos-Ángeles. 2016a. Effect of culture medium and incubation on the characteristics of micropropagated agave plants. *Cien. Inv. Agr.* 43(2):263-272. DOI: 10.4067/S0718-16202016000200009
- Enríquez-del Valle. J. R., S.E. Alcara-Vázquez, G. Rodríguez-Ortiz, M.E. Miguel-Luna y C. Manuel Vázquez. 2016b. Fertirriego en vivero a plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas-aclimatizadas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.7 (5): 1167-1177.
- Enríquez- del Valle J. R. 2008. La Propagación y Crecimiento de Agaves. Fundación Produce Oaxaca A. C. e Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. México. 46 p.
- Enríquez-del Valle. J. R., G. Carrillo-Castañeda y J. L. Rodríguez-de la O. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28 (2), 175-178.
- García-Quintana, Y. A. Álvarez-Brito y E. Guízar-Nolazco. 2007. Ensayo de procedencias de *Pinus caribaea* var *caribaea* en alturas de pizarras, viñales, pinar del río, cuba. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*. 13 (2): 125-129.
- Hazra, K. S., S. Das and K. A Das. 2002. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 70, 235-240.
- Lee-Espinosa, H., A. Laguna-Cerda, J. Murguía-González, P. Elorza-Martínez, L. Iglesias-Andreu, B. García-Rosas, F. A. Barredo-Pool y N. Santana-Buzzy. 2007. Regeneración *in vitro* de *Laelia anceps* ssp. *dawsonii*. *Revista Científica UDO Agrícola*, 7 (1): 58-67.
- Martínez-Villegas, Y. M., M. Andrade-Rodríguez, A. Villegas-Monter, I. Alia-Tejacal, O. G. Villegas-Torres y V. López-Martínez. 2011. Cultivo *in vitro* de pitayo (*Stenocereus stellatus* [Pfeiffer] Riccobono). *Revista Chapingo Horticultura* 17 (3): 95-105.

- Miguel-Luna M.E., J.R. Enríquez-del Valle, V.A. Velasco-Velasco, Y. Villegas-Aparicio y J. C. Carrillo-Rodríguez. 2014. Concentración de benciladenina, tipo y concentración de carbohidratos en el medio de cultivo para proliferación de brotes de *Agave americana*. Rev. FCA UNCUYO 46 (1): 97-107.
- Molina-Guerrero, J.A., J. E. Botello-Álvarez, A. Estrada-Baltazar, J. L. Navarrete-Bolaños, H. Jiménez-Islas, M. Cárdenas-Manríquez y R. Rico-Martínez. 2007. Compuestos volátiles en el Mezcal. Revista Mexicana Ingeniería Química 6: 41-50.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Ocampo, F. y V. Manuel-Núñez. 2007. Propagación *in vitro* de *Psidium guajaba* mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales. Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria. 8 (1): 22-27.
- Orellana-Pérez, P., L. García, I. Bermúdez, N. Veitía y C. Romero. 2002. Manejo de hijos y ápices de cultivares de *Musa* spp. Para iniciar la micropropagación y comportamiento durante seis subcultivos *in vitro*. Biotecnología Vegetal. 2(2): 77-81.
- Pedrosa-Manrique, A. J. y Tupaz-Villacorte, A. W. 2008. Micropropagación de *Ilex kunthiana* Triana & Planchon (Aquifoliaceae), una especie de gran importancia en programas de revegetación. Revista Colombiana de Biotecnología 10 (2): 72- 84.
- Ríos-Ramírez, S. del C., J. R. Enríquez-del Valle, G. Rodríguez-Ortiz, J. Ruiz-Luna y V. A. Velasco-Velasco. 2018. *In vitro* formation of adventitious shoots on caulinary tissue of physiologically contrasting *Agave angustifolia* plants. Emirates Journal of Food and Agriculture. 30 (1): 49-56.
- Ruvalcaba-Ruíz, D., D. Rojas-Bravo y A. J. Valencia-Botín. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphantha retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. Tropical and Subtropical Agroecosystems, (12): 139-143
- Sánchez-Hernández, M. A., C. Sánchez-Hernández, C. Villanueva-Verduzco, I. Gil-Vázquez, M. C. Jiménez-Rojas y I. Sánchez-Cabrera. 2009. Multiplicación *in vitro* vía organogénesis de calabaza. Agronomía Mesoamericana 20 (1): 11-22.
- Salazar, E., P. González, y C. Hernández. 2009. Multiplicación *in vitro* de *Agave cocui* Trelease a través de yemas axilares. Agronomía Tropical 59 (2): 129-135.
- Valenzuela-Sánchez, K. K., R. E. Juárez-Hernández, A. Cruz-Hernández, V. Olal-de Portugal, M. E. Valverde, y O. Paredes-López. 2006. Plant Regeneration of *Agave tequilana* by Indirect Organogenesis. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 42, 336-34

CAPITULO IV.

ENRAIZADO DE BROTES *in vitro* y ACLIMATACIÓN DE PLANTAS DE *Agave potatorum* Zucc.

[*In vitro* ROOTING OF SHOOTS AND ACCLIMATIZATION OF PLANTS OF *Agave potatorum* Zucc.]

Ariadna Ivon Bautista Castellanos^{1§}, José Raymundo Enríquez del Valle¹, Vicente Arturo Velasco Velasco¹ y Gerardo Rodríguez Ortiz¹.

Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Ex-Hacienda de Nazareno Xoxocotlán, Oaxaca, México. C. P. 71230. Tel: (01951) 5170788, 5170444. §Autor responsable: (baus.caste@gmail.com).

RESUMEN

La propagación *in vitro* es un método complementario a la germinación de semillas en vivero, para aumentar la producción de plantas a establecer en campo. En este trabajo se evaluaron diferentes concentraciones de las sales minerales (MS) y concentraciones de las auxinas ácido Indol-acético (AIA) y ácido Indolbutírico (AIB) en el enraizado de brotes *in vitro*, así como la posterior aclimatación en invernadero de plantas micropropagadas. Se obtuvo de 94 a 96% de brotes enraizados, entre los 13 y los 37 días de incubación en medio de cultivo con 0.1 a 0.5 mg AIB L⁻¹, que fue mejor respuesta de enraizado, que los brotes en medio de cultivo sin auxina, o en medio de cultivo con AIA. Transcurridos 90 días de que las plantas se transfirieron a

invernadero, de 87% a 90% sobrevivió y las plantas a las que se aplicó la solución un Steiner al 50% desarrollaron 8.9 hojas, la hoja más larga fue de 8.4 cm, el tallo de 10.27 mm de diámetro, 4.15 g de peso fresco y 0.31 g de peso seco de la planta.

Palabras clave: aclimatación, *Agave potatorum* Zucc., micropropagación, nutrición vegetal, propagación clonal.

SUMMARY

In vitro propagation is a complementary method to seed germination in nursery, to increase the production of plants to be established in the field. In this work, different concentrations of mineral salts (MS) and auxol-acetic acid (AIA) and Indolbutyric acid (AIB) auxin concentrations were evaluated in rooting outbreaks in vitro, as well as subsequent greenhouse acclimatization of micropropagated plants . From 94 to 96% of rooted outbreaks were obtained, between 13 and 37 days of incubation in culture medium with 0.1 to 0.5 mg AIB L⁻¹, which was better rooted response, than shoots in culture medium without auxin , or in culture medium with AIA. After 90 days that the plants were transferred to the greenhouse, from 87% to 90% survived and the plants to which the solution was applied a 50% Steiner developed 8.9 leaves, the longest leaf was 8.4 cm, the stem of 10.27 mm in diameter, 4.15 g of fresh weight and 0.31 g of dry weight of the plant.

Key words: acclimatization, *Agave potatorum* Zucc., clonal propagation, micropropagation, plant nutrition,

4.1 INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Agave*, han sido usadas durante al menos 30 siglos por los habitantes del territorio de México, y en diversas regiones son elementos importantes de la cultura y actividad económica (Colunga-García *et al.* 2007). *Agave potatorum* es una especie silvestre o cultivada en

extensiones pequeñas, apreciada como materia prima para elaborar la bebida destilada denominada mezcal, y por su creciente aprovechamiento sin aplicar programas de manejo, sus poblaciones están disminuyendo. Por lo que, desde la década de 1990's grupos de agricultores de la sierra sur de Oaxaca han implementado la propagación de *Agave potatorum* mediante la germinación de semillas, su desarrollo en vivero y establecen pequeñas plantaciones. Pero es conveniente incrementar la cantidad de plantas que se producen por lo que se deben implementar acciones para lograr la conservación de agaves mediante la colecta de germoplasma, su propagación y establecer plantaciones (Pérez-Molphe *et al.*, 2012; Enríquez-del Valle *et al.*, 2016a) y una de las alternativas para producir mayor cantidad de plantas, es la propagación *in vitro* (Monja-Mio *et al.*, 2015) que se debe complementar con acciones de selección de las plantas a propagar, el desarrollo del protocolo de propagación de acuerdo a la especie, en las etapas de laboratorio, invernadero de adaptación y vivero, en la cual se produzcan gran cantidad de plantas de calidad sanitaria y fisiológica.

El proceso de propagación *in vitro* incluye las etapas de: 1) Establecimiento de cultivos asépticos; 2) multiplicación de propágulos; 3) enraizado de brotes en preparación para trasplante a suelo; 4) transferencia de las plantas micropropagadas a contenedores con sustrato para su aclimatación en invernadero. En la etapa 3, para enraizar los brotes *in vitro*, éstos se establecen en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento (RC) o bien que contengan RC de tipo auxina, entre las que se encuentran el ácido indol-3-acético (AIA), el ácido naftalenacético (ANA) y ácido Indol-3-butírico (AIB), las cuales inducen que en tejidos del tallo algunas células asuman divisiones celulares, la formación de centros meristemáticos que dan origen a iniciales de raíces, el desarrollo y emergencia de raíces adventicias (Woodward y Bartel, 2005). Durante la etapa del enraizado *in vitro* de brotes de *Agave potatorum*, Enríquez-del Valle *et al.* (2016b) evaluaron la

composición del medio de cultivo, al variar las concentraciones de las sales minerales (50, 75 y 100%) y AIB (0, 0.5 y 1 mg L⁻¹). Los resultados mostraron que el 90% de brotes formaron raíces en medios de cultivo con las sales minerales a 100% y sin auxinas, pero que mayor cantidad de brotes formaron raíces y en menos tiempo cuando se establecieron en medios de cultivo con 75% de las sales minerales y con 0.5 a 1 mg de AIB L⁻¹, pero en *A. potatorum* no se ha evaluado el efecto de AIA en el enraizado de brotes, solo o en combinación con AIB. En la micropropagación de *Agave marmorata*, Aguilar-Jiménez y Rodríguez-de la O (2018) reportaron que los brotes formaron raíces al establecerlos en medio de cultivo con las sales minerales MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100% y con 10 mg L⁻¹ de la auxina AIA. Las plantas micropropagadas se establecieron durante tres semanas en ambiente de invernadero y contenedores con sustrato a base de turba de musgo y perlita, así como turba y arena de río, en que 100% de las plantas sobrevivieron. Las plantas micropropagadas presentan ineficiente funcionamiento de los estomas y del aparato fotosintético, escasa formación de cutícula de las hojas; además las raíces deben aumentar su eficiencia y conexión con los haces conductores del tallo (Chandra *et al.*, 2010) características que dificultan su establecimiento directo a condiciones de vivero o campo, en donde impera menor humedad relativa, variaciones de temperatura en rangos más amplios, irradiación alta (hasta 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), y limitado abastecimiento de nutrientes, por lo que dependiendo de la especie, las plantas se establecen durante 30 a 90 días en contenedores con sustrato de densidad aparente baja 0.11 a 0.5 g cm⁻², que retenga humedad pero drene el exceso de agua para tener porosidad de aireación 33 a 77% (Blok y Wever, 2008), además de ambiente de invernadero con humedad relativa alta, radiación solar disminuida 30-50% mediante sombra, condiciones necesarias para que en las plantas ocurran cambios morfológicos y fisiológicos para aumentar su capacidad de aclimatación *ex vitro*, lo que se conoce como endurecimiento de las plántulas (Deb e Imchen, 2010; Lesar, 2012; Alvarez *et al.*, 2012).

Se tienen registros de plantas de agaves que han sido aclimatadas con éxito: *A. angustifolia* (Monja-Mio *et al.*, 2015, Enríquez-del Valle *et al.*, 2012), *A. potatorum*, *A. americana* var. *oaxacensis* (Enríquez-del Valle *et al.*, 2013, Cruz-García *et al.*, 2017), trabajos en los que se ha demostrado la importancia de las características del sustrato y el abastecimiento nutrimental.

Por lo mencionado anteriormente el objetivo del presente trabajo fue evaluar el enraizado de brotes que se establecieron en medios de cultivo con concentraciones diferentes de sales minerales y auxinas, y posteriormente la aclimatación y desarrollo de las plantas micropropagadas que en condiciones de invernadero recibieron dosis diferentes de fertilización.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Obtención del material vegetal

La investigación se hizo en el laboratorio de cultivos de tejidos vegetales y en un invernadero del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, México, ubicado en 17°04' N, 96°46' O y 1550 msnm. El material vegetal fueron plantas obtenidas a partir de la germinación *in vitro* de semillas colectadas de plantas silvestres de *Agave potatorum* Zucc, en San Pedro Totolapan, Distrito de Tlacolula, Oaxaca, México, 16°40' de Latitud norte y 96°18' longitud oeste, 940 msnm. Para inducir la formación y proliferación de brotes adventicios, se siguió el procedimiento descrito por Luna-Luna *et al.*, (2017) Teniendo el material vegetal suficiente se realizaron dos experimentos: 1) Enraizado de brotes y, 2) Aclimatación de plantas micropropagadas.

4.2.2 Experimento 1. Enraizado de brotes

De los racimos de 15 a 23 brotes heterogéneos en tamaño en cada cultivo *in vitro*, se seleccionaron los brotes de 4 a 5.5 cm de longitud, estos se separaron individualmente y se transfirieron tres brotes en cada frasco de 8.5 cm de altura, 5.4 cm de diámetro interno y 160 cm³ que contenían 20

mL de medio de cultivo para inducir la formación de raíces adventicias. Se prepararon 18 variantes de medios de cultivos que contenían 100 mg L^{-1} de myo-inositol, 1 mg L^{-1} de tiamina-HCl, 25 g L^{-1} de sacarosa, que variaron en: 1) las sales minerales MS en concentraciones diferentes (75 o 100%); 2) diversas concentraciones (0, 0.1 y 0.5 mg L^{-1}) de ácido indolacético (AIA) y 3) (0, 0.1 y 0.5 mg L^{-1}) de ácido indolbutírico (AIB). En todas las variaciones de medio de cultivo, el pH se ajustó a 5.8 antes de agregar 5.7 g L^{-1} de agar. Se establecieron tres brotes en cada frasco de cultivo y se incubaron por 66 días en condiciones de iluminación LED, $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, en fotoperiodo de 16 h y 8 h de oscuridad, y temperatura en el rango de 15 a $29 \text{ }^\circ\text{C}$.

El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente al azar con arreglo de tratamientos factorial $2 \times 3 \times 3$ (dos niveles del factor concentración de sales minerales; tres niveles del factor concentración de AIA; tres niveles del factor concentración de AIB). Se obtuvieron 18 tratamientos y para evaluar los porcentajes de brotes que formaron raíces adventicias, la unidad experimental fue un frasco con tres brotes, teniendo ocho repeticiones por tratamiento, lo que dio 144 unidades experimentales. Para evaluar el desarrollo de la parte aérea y raíces, la unidad experimental fue un brote, al seleccionar un brote de cada uno de ocho frascos por tratamiento. A los 66 días, en cada unidad experimental se evaluó el número de hojas, la longitud de la hoja más larga, número de brotes, diámetro del tallo, número de raíces. Y de una planta de cada frasco se registró la longitud de la raíz más larga, volumen de raíz, peso fresco y peso seco. Se hizo transformación de variables: número de hojas (raíz cuadrada en combinación con logaritmo natural), número de brotes (raíz cuadrada con logaritmo decimal), longitud de raíz (arco seno con tangente) y volumen de raíz (logaritmo natural con raíz cuadrada) para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, así mismo se sometieron a análisis de varianza y

comparación de medias (Tukey, 0.05), así como contrastes ortogonales. Para las rutinas de análisis estadísticos se usó el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

4.2.3 Experimento 2. Aclimatación de plantas micropropagadas

Se obtuvieron *in vitro* 300 brotes de 3-4 cm de altura de *A. potatozum* en la etapa de multiplicación de propágulos, que se transfirieron a la etapa de enraizado de brotes. Se establecieron tres brotes en cada frasco de 160 cm³, con 20 mL de medio de cultivo que tenía las sales minerales MS a 100% de concentración, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 1 mg L⁻¹ de tiamina-HCl, 25 g L⁻¹ de sacarosa, 1 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 antes de agregar 5.7 g de agar L⁻¹. Los cultivos *in vitro* se incubaron durante 66 días en condiciones similares que en el experimento 1, y transcurrido ese tiempo se obtuvieron plantas micropropagadas que se extrajeron de los frascos y fueron lavadas para retirar el residuo de medio de cultivo. Para el experimento se seleccionaron 201 plantas, las más homogéneas en tamaño, que se transfirieron a charolas de 26 cm de ancho, 53 cm de longitud y 6.5 cm de altura, divididas en 50 cavidades de 90 cm³ con sustrato turba-perlita (1:2). Se establecieron durante 60 días en el invernadero de aclimatación, expuestas a humedad relativa alta, 80-90%, y radiación solar disminuida a 400-500 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$. Las plantas recibían diariamente riego intermitente por nebulización de 10 seg cada 12 minutos, en horario de las 11:00 hrs a las 16:00 hrs. Las 201 plantas se separaron en tres grupos de 67 plantas, las cuales se fertirrigaron, después del periodo de nebulización, a nivel de sustrato tres veces por semana con 20 mL de la solución nutritiva Steiner (1984) en diluciones diferentes: 25%, 50% y 100%. Transcurridos 60 días de aclimatación, las plantas se trasladaron a un segundo invernadero donde se expusieron durante 30 días a mayor radiación solar disminuida a 600-700 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$, mediante malla sombra, ventilación y humedad relativa de 40-60%. Las plantas ya no

recibían riego por nebulización, pero se fertirrigaban tres veces por semana a nivel sustrato con la correspondiente dilución de solución nutritiva.

Cuando transcurrieron 30 días de que inicio la aplicación de la solución nutritiva, de cada grupo de 67 de plantas, se eligieron 10 plantas a las cuales se les cuantificó el número de hojas, la longitud y anchura de la hoja más grande, diámetro del tallo, y a los 90 días además de las variables mencionadas se cuantificó el peso fresco y peso seco de la parte aérea y raíz. La unidad experimental fue una planta y hubo 10 repeticiones por tratamiento. De las 67 plantas en cada tratamiento se determinaron los porcentajes de plantas adaptadas. El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente al azar. Los datos de cada variable se sometieron a análisis de varianza y comparaciones de medias (Tukey, 0.05), con el uso del programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Experimento 1. Enraizado de brotes

Los brotes en que surgieron raíces adventicias, se observaron a partir de los 13 y hasta los 37 días de incubación. Se considera que el *A. potatorum* es una especie de difícil enraizado, pues en el medio de cultivo sin auxinas el 37% de los brotes formó raíces adventicias, mientras que los brotes en medios de cultivo con AIA o AIB, solos o combinados, mayor cantidad de brotes, entre 88 a 96% del total formaron raíces. Al micropropagar *Agave americana* var. *oaxacensis* (Miguel-Luna *et al.*, 2013), y *Agave angustifolia* (Enríquez del-Valle *et al.*, 2005), todos los brotes formaron raíces adventicias a partir de los 12 y hasta los 21 días de incubación, aun en los medios de cultivo sin auxinas.

Transcurridos 66 días de incubación en la etapa de enraizado de brotes (Figura 7), los análisis de varianza (Cuadro 4) mostraron que las concentraciones del ácido Indolbutírico (AIB) tuvieron efecto diferente altamente significativo ($p \leq 0.01$) en el número de raíces. La interacción del ácido Indolacético (AIA) y del ácido Indolbutírico (AIB), tuvo efecto altamente significativo ($p \leq 0.01$) en el diámetro del tallo. Las concentraciones de sales minerales (Smin), tuvieron efectos diferentes significativos ($p \leq 0.05$) en el diámetro del tallo y peso fresco de la parte aérea. La interacción Smin con AIB tuvo efecto significativo en el diámetro de tallo; mientras que la triple interacción Smin-AIB-AIA, tuvo efecto significativo en diámetro del tallo. Los resultados difieren con lo descrito por Reyes-Zambrano *et al.* (2016), quienes mencionaron que en *Agave americana* L. tanto la cantidad de raíces y su longitud de la misma, no se vieron afectadas por el AIB.



Figura 7. Plantas obtenidas *in vitro* a partir del enraizado de brotes a los 66 días de incubación.

Al ordenar los datos en función de la concentración de las sales minerales en el medio (Cuadro 5), los brotes establecidos con Smin-100% y los brotes en el medio con Smin-75%, el 87.5% y 92.12% de esos brotes habían formado raíces, además los tallos fueron de 6.3 y 5.6 mm de diámetro, y su peso fresco de la parte aérea fue de 1.18 y 0.96 g, respectivamente, magnitudes significativamente diferentes (Tukey 0.05). Enríquez-del Valle *et al.* (2005) mencionan que las sales minerales

representan 7.87 % de costos, de constituyentes de medios de cultivo, y que al disminuir a 75 % la concentración de sales minerales el costo del medio de cultivo es 1.07% menor, sin afectar negativamente la cantidad de brotes que forman raíces y la calidad de las plantas.

Cuadro 4. Resumen del análisis de varianza de diversas características de plantas de *Agave potatorum* Zucc, obtenidas en la etapa de enraizado de brotes, en medios de cultivo, que variaron en concentración de auxinas y sales minerales a los 66 días de incubación.

| Cuadros Medios y Significancia | | | | | | | |
|---------------------------------------|-----|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
| F.V | GL | AHL (cm) | NH | NR | LR (cm) | NB | DT (mm) |
| AIA | 2 | 1.18 ^{ns} | 0.001 ^{ns} | 3.55 ^{ns} | 0.04 ^{ns} | 0.002 ^{ns} | 0.24 ^{ns} |
| AIB | 2 | 1.80 ^{ns} | 0.01 ^{ns} | 33.08** | 0.11 ^{ns} | 0.08 ^{ns} | 3.20 ^{ns} |
| Smin | 1 | 0.42 ^{ns} | 0.004 ^{ns} | 0.53 ^{ns} | 0.18 ^{ns} | 0.17 ^{ns} | 18.34* |
| AIA*AIB | 4 | 1.57 ^{ns} | 0.003 ^{ns} | 2.70 ^{ns} | 0.45 ^{ns} | 0.09 ^{ns} | 16.68** |
| AIA*Smin | 2 | 1.86 ^{ns} | 0.00 ^{ns} | 5.49 ^{ns} | 0.09 ^{ns} | 0.12 ^{ns} | 1.62 ^{ns} |
| AIB*Smin | 2 | 0.67 ^{ns} | 0.01 ^{ns} | 6.90 ^{ns} | 0.23 ^{ns} | 0.16 ^{ns} | 9.32* |
| AIA*AIB*Smin | 4 | 1.06 ^{ns} | 0.00 ^{ns} | 2.97 ^{ns} | 0.15 ^{ns} | 0.09 ^{ns} | 6.16* |
| Error | 126 | 1.51 | 0.006 | 4.04 | 0.350 | 0.060 | 2.15 |
| Total | 143 | 96.26 | | | | | |
| F.V | GL | PFA(g) | PSA(g) | PFR(g) | PSR(g) | | |
| AIA | 2 | 0.10 ^{ns} | 0.00 ^{ns} | 0.001 ^{ns} | 0.00 ^{ns} | | |
| AIB | 2 | 0.70* | 0.014 ^{ns} | 0.009* | 0.00** | | |
| Smin | 1 | 1.66* | 0.006 ^{ns} | 0.004 ^{ns} | 0.00 ^{ns} | | |
| AIA*AIB | 4 | 0.07 ^{ns} | 0.002 ^{ns} | 0.003 ^{ns} | 0.00 ^{ns} | | |
| AIA*Smin | 2 | 0.08 ^{ns} | 0.005 ^{ns} | 0.001 ^{ns} | 0.00 ^{ns} | | |
| AIB*Smin | 2 | 1.20* | 0.010 ^{ns} | 0.007* | 0.00 ^{ns} | | |
| AIA*AIB*Smin | 4 | 0.45 ^{ns} | 0.009 ^{ns} | 0.003 ^{ns} | 0.00 ^{ns} | | |
| Error | 126 | 0.211 | 0.007 | 0.002 | 0.00 | | |
| Total | 143 | 96.26 | | | | | |

FV= fuentes de variación; GL= grados de libertad; AIA=ácido Indolacético; AIB=ácido Indolbutírico; Smin= sales minerales; AHL=altura de hoja más larga; NH=número de hojas; NR= número de raíz; LR=longitud de la raíz; NB=Número de brotes; DT=diámetro del tallo; PFA=peso fresco parte aérea; PSA=peso seco de la parte aérea; PFR=peso fresco raíz; PSR=peso seco de raíz *= significativo ($p > 0.05$); **= altamente significativo ($p \leq 0.01$).

Los contrastes ortogonales (cuadro 6) indican que los brotes que se establecieron en medios de cultivo con auxinas, solas o combinadas, formaron significativamente ($P \leq 0.05$) mayor NH, NR, LR, DT, PSR, en comparación a los brotes en medios de cultivo sin auxinas. Los brotes en medios de cultivo con AIB formaron significativamente ($P \leq 0.05$) más NH, NR, LR, que los brotes que se establecieron en medios de cultivo en que se agregaron AIB y AIA juntas. Los brotes en medios de cultivo con AIB formaron significativamente ($P \leq 0.05$) más NR y PSR, que los brotes en medios de cultivo con AIA. Los brotes en medios de cultivo con 0.5 mg L⁻¹ de AIA desarrollaron tallos de

6.4 mm de diámetro, magnitud 3.2% mayor y significativamente ($P \leq 0.05$) diferente al diámetro de tallo de los brotes en medio de cultivo con 0.1 mg L^{-1} de AIA.

Cuadro 5. Características de enraizado de brotes de *Agave potatorum* Zucc., cultivados *in vitro* en función de las sales minerales a los 66 días.

| Factor | BroF(%) | AHL (cm) | NH | NR | LR (cm) | NB | DT (mm) |
|-------------|---------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------|-----------------|
| Smin | | | | | | | |
| 75% | 92.1% | 5.8±1.1a | 7.1±1.4a | 4.0±0.7a | 4.85±3.0a | 2.6±2.4a | 5.6±1.6b |
| 100% | 87.5% | 5.9±1.3a | 6.7±1.5a | 4.2±1.9a | 4.40±2.6a | 3.0±2.3a | 6.3±1.7a |
| Smin | | PFA (g) | PSA (g) | PFR (g) | PSR (g) | | |
| 75% | 92.1% | 0.96±0.5b | 0.11±0.1a | 0.04±0.05a | 0.01±0.01a | | |
| 100% | 87.5% | 1.2±0.5a | 0.12±0.1a | 0.03±0.03a | 0.01±0.01a | | |

Smin= sales minerales; BroF=porcentaje de brotes que formaron raíces; AHL=altura de hoja más larga; NH=número de hojas; NR= número de raíz; LR=longitud de la raíz; NB=Número de brotes, DT=diámetro del tallo; PFA=peso fresco parte aérea; PSA=peso seco de la parte aérea; PFR=peso fresco raíz; PSR=peso seco de raíz. Medias con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

Cuando Miguel-Luna *et al.*, (2013) micropropagaron el *Agave americana* var. *oaxacensis*, los brotes en medio de cultivo con 0.5 mg L^{-1} AIB, formaron significativamente la mayor cantidad de raíces que los brotes en medio de cultivo sin auxina. Así mismo, Aguilar-Jiménez y Rodríguez-De la O (2018) describieron que en la micropropagación de *A. marmorata*, la concentración de auxinas, 0, 0.3, 1.0, 3.0 y 10 mg L^{-1} de AIA tuvieron efecto diferente en las características de las raíces que formaron los brotes, ya que al incrementar la concentración de AIA hasta 10 mg L^{-1} los brotes desarrollaron raíces de mayor longitud. Para el enraizado de brotes de *Furcraea macrophylla* Baker, en medio de cultivo con AIA y en el medio de cultivo con AIB, el 100% y 92% de los brotes formaron raíces (Martínez y Pacheco 2006). Lo que indica que, para cada especie en el enraizado de brotes, el tipo y concentración de auxinas difieren en nivel de efecto.

Cuadro 6. Contrastes ortogonales de características de enraizado de brotes de *Agave potatorum* Zucc., cultivados *in vitro* a los 66 días.

| GC | BroF % | AHL | NH | NR | NB | LR | DT | PFA | PSA | PFR | PSR |
|-------|-----------|------|-------------|-------------|-------|-------------|-------------|-------|-------|-------|---------------|
| G1 vs | 73 | 5.7a | 6.0b | 2.6b | 2.7a | 3.0b | 4.7b | 0.91a | 0.11a | 0.01a | 0.003b |
| G2 | 92 | 5.9a | 7.0a | 4.3a | 2.8a | 4.8a | 6.1a | 1.09a | 0.11a | 0.03a | 0.008a |
| G2 vs | 92 | 5.9a | 7.0b | 4.3b | 2.8a | 4.8b | 6.1a | 1.09a | 0.11a | 0.03a | 0.008a |
| G3 | 95 | 6.2a | 7.1a | 4.7a | 2.7a | 5.0a | 6.6a | 1.07a | 0.12a | 0.04a | 0.009a |
| G2 vs | 92 | 5.9a | 7.0a | 4.3a | 2.8a | 4.8a | 6.1a | 1.09a | 0.11a | 0.03a | 0.008a |
| G4 | 89 | 5.6a | 7.0b | 3.5b | 2.5a | 4.4b | 6.3a | 0.95a | 0.09a | 0.02a | 0.005a |
| G3 vs | 95 | 6.2a | 7.1a | 4.7a | 2.7a | 5.0a | 6.6a | 1.07a | 0.12a | 0.04a | 0.009a |
| G4 | 89 | 5.6a | 7.0a | 3.5b | 2.5a | 4.4a | 6.3a | 0.95a | 0.09a | 0.02a | 0.005b |
| G5 vs | 88 | 5.1a | 6.9a | 3.8a | 2.1a | 4.2a | 6.2b | 0.96a | 0.09a | 0.02a | 0.005a |
| G6 | 90 | 6.1a | 7.0a | 3.1a | 2.9 a | 4.6a | 6.4a | 0.94a | 0.09a | 0.02a | 0.005a |
| G7 vs | 96 | 6.2a | 7.3a | 4.5a | 3.0 a | 4.6a | 6.7a | 0.96a | 0.12a | 0.03a | 0.007a |
| G8 | 94 | 6.1a | 6.9a | 4.89a | 2.4 a | 5.3a | 6.6a | 1.18a | 0.12a | 0.06a | 0.01a |

GC=grupos comparados; G1= test; G2= AIB+AIA; GC2= AIB+AIA ; G3= AIB; G4= AIA; G5= AIA 0.1 mg L⁻¹; G6= AIA 0.5 mg L⁻¹; G7= AIB 0.1 mg L⁻¹; G8= AIB 0.5 mg L⁻¹; BroF=porcentaje de brotes formados; AIA=ácido Indolacético; AIB=ácido Indolbutírico AHL=altura de hoja más larga; NH=número de hojas; NR= número de raíz; LR=longitud de la raíz; NB=Número de brotes, DT=diámetro del tallo, PFA=peso fresco parte aérea; PSA=peso seco parte aérea; PFR=peso fresco raíz; PSR=peso seco de raíz. Medias con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

4.3.2 Aclimatación de plantas micropropagadas

Las plantas micropropagadas poseen características morfológicas y fisiológicas, cutícula delgada e ineficiente funcionamiento de los estomas, por lo que son susceptibles a la deshidratación, que dificultan su transferencia directa a condiciones *ex vitro*, por ello es importante someter las plantas a una etapa de aclimatación (Pospíšilová *et al.* 2000). Por lo que los primeros 10 días de aclimatación se les debe proporcionar humedad relativa alta y en días posteriores exponerlas gradualmente a menor humedad relativa y mayor radiación solar (Gil-Rivero *et al.*, 2017). En diversas especies de agaves micropropagados: *A. fourcroydes* (Abreu *et al.*, 2007), *A. americana* var *oaxacensis* (Yescas-Arreola *et al.*, 2016; Cruz-García *et al.*, 2017), *A. potatorum* (Luna-Luna *et al.*, 2017) se describe que durante los primeros 35 a 70 días del periodo de aclimatación, en las plantas ocurrió la senescencia de hojas que las plantas formaron durante su cultivo *in vitro*, que fueron sustituidas por otras hojas que ya presentaban características de mayor: área foliar,

suculencia, engrosadas, rígidas, cantidad de haces vasculares, que son características relacionadas a la adaptación al ambiente *ex vitro*.

En el presente trabajo al inicio de la etapa de aclimatación las plantas de *Agave potatorum* presentaban hojas de 5 cm longitud y 0.7 cm de ancho, flácidas, y de bordes lisos. A los 60 días de exposición a mayor radiación solar, las plantas habían formado nuevas hojas que fueron más rígidas y gruesas, además de que tenían espinas marginales (Figura 8).



Figura 8. Plantas micropropagadas de 60 días de aclimatación.

Los análisis de varianza (Cuadro 7) a los 30 días de aclimatación, muestran que las concentraciones de las soluciones nutritivas tuvieron efectos diferentes altamente significativos ($p \leq 0.01$) en el número y ancho de las hojas, así como en el diámetro del tallo. A los 90 días (Figura 9), las concentraciones de las soluciones nutritivas tuvieron efectos diferentes significativos ($p \leq 0.05$) en NH, ANH, DT, AHL, VOLR y PFA (Cuadro 7).



Figura 9. Plantas de *A. potatorum* fertirrigadas con las concentraciones de solución nutritiva a los 90 días de aclimatación en invernadero.

Cuadro 7. Resumen de catorce análisis de varianza de características de plantas de *Agave potatorum* Zucc., micropropagadas, que durante 90 días de su aclimatación en invernadero recibieron solución nutritiva (Steiner, 1984) en concentraciones diferente.

| Cuadrados Medios y Significancia | | | | | | | | |
|----------------------------------|----|--------|--------|--------|-------|--------|---------|--------|
| F.V | GL | AHL30 | AHL90 | NH30 | NH90 | ANH30 | ANHS90 | DT30 |
| SN | 2 | 0.42ns | 7.62* | 8.23** | 5.63* | 0.15** | 0.32* | 3.30* |
| Error | 27 | 1.41 | 1.97 | 0.75 | 1.51 | 0.01 | 0.05 | 0.97 |
| Total | 29 | | | | | | | |
| F.V | GL | DT90 | NRP90 | VOLR | PFA | PSA | PFR | PSR |
| SN | 2 | 9.04* | 7.23ns | 0.08* | 7.48* | 0.03ns | 0.001ns | 0.00ns |
| Error | 27 | 1.66 | 2.4 | 0.01 | 1.79 | 0.28 | 0.004 | 0.001 |
| Total | 29 | | | | | | | |

F.V= fuentes de variación; GL= grados de libertad; SN= solución nutritiva; AHL30= altura de la hoja más larga; AHL90=altura de la hoja más larga a los 90 días; NH30= número de hojas; NH90= número de hojas a los 90 días; ANH30= ancho de la hoja; ANH90= ancho de la hoja a los 90 días; DT30= diámetro del tallo; DT90=diámetro del tallo a los 90 días; NRP= número de raíces principales; VOLR= volumen de raíz; PFA= peso fresco de la parte aérea; PSA= peso seco de la parte aérea; PFR= peso fresco de la raíz; PSR= peso seco de la raíz; *= significativo ($p > 0.05$); **= altamente significativo ($p \leq 0.01$).

Las plantas mostraron crecimiento en relación positiva a la cantidad de nutrientes que recibieron mediante la solución nutritiva, ya que a los 90 días de aclimatación las plantas fertirrigadas con SN-25% y las que se fertirrigaron con SN-50%, tuvieron en promedio 7.4 y 8.9 hojas; la hoja más grande fue de 6.6 y 8.4 cm de longitud, de 1.0 y 1.3 cm de ancho; el tallo fue de 8.5 y 10.2 mm de diámetro; la parte aérea tuvo 2.4 y 4.1 g de peso fresco, así como 0.19 y 0.31 g de peso seco, magnitudes que en cada caso fueron significativamente diferentes (Tukey, 0.05). Las plantas a las que se aplicó la SN-100% no mostraron crecimiento adicional respecto a las plantas fertirrigadas con SN-50% (cuadro 8).

Resultados diferentes a los descritos por Cruz-García *et al.* (2017), Pérez-Santiago *et al.* (2014) en *Agave americana* y Enríquez-Del Valle *et al.* (2012) en *Agave angustifolia*, quienes mencionan que las plantas a las que se aplicó solución nutritiva al 100%, fueron las más grandes.

Cuadro 8. Características plantas de *Agave potatorum* Zucc., micropropagadas aclimatizadas en invernadero por 90 días.

| Fact SN | SP (%) | AHL30 (cm) | AHL90 (cm) | NH30 | NH90 | ANH30 (cm) | ANH90 (cm) | DT30 (mm) |
|------------|-----------|------------------|-----------------|----------------------------|-------------------|-------------------|---------------|--------------|
| 25 | 84 | 5.2±1.1a | 6.7±1.3b | 5.6±0.7b | 7.4±1.0b | 0.6±0.1b | 1.1±0.2b | 5.7±0.9a |
| 50 | 90 | 5.5±1.0a | 8.4±1.2a | 7.0±0.7a | 8.9±1.2a | 0.8±0.2a | 1.3±0.2a | 6.73±1.0a |
| 100 | 87 | 5.1±1.5a | 7.7±1.7ab | 7.3±1.2a | 8.2±1.5ab | 0.78±0.1a | 1.4±0.3a | 6.6±1.0a |
| Fact SN | | DT90 (mm) | NRP90 | VOLR (cm ³) | PFA (g) | PSA (g) | PFR (g) | PSR (g) |
| 25 | 84 | 8.5±0.9b | 5.1±1.9a | 5.2±0.2b | 2.44±1.07b | 0.19±0.08b | 0.10±0.05a | 0.01±0.00a |
| 50 | 90 | 10.3±1.6a | 5.9±0.9a | 5.3±0.1ab | 4.15±1.62a | 0.31±0.12a | 0.11±0.05a | 0.01±0.00a |
| 100 | 87 | 8.8±1.2b | 6.8±1.8a | 5.4±0.1a | 3.07±1.26ab | 0.25±0.08ab | 0.12±0.07a | 0.01±0.00a |

SN= solución nutritiva; SP=plantas supervivientes; AHL30= altura de la hoja más larga; AHL90=altura de la hoja más larga a los 90 días; NH30= número de hojas; NH90= número de hojas a los 90 días; ANH30= ancho de la hoja; ANH90= ancho de la hoja a los 90 días; DT30= diámetro del tallo; DT90=diámetro del tallo a los 90 días; NRP= número de raíces principales; VOLR= volumen de raíz; PFA= peso fresco de la parte aérea; PSA= peso seco de la parte aérea; PFR= peso fresco de la raíz; PSR= peso seco de la raíz; Medias con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente ($p \leq 0.05$).

Un sustrato con suficientes poros pequeños para retener el agua que va a absorber la planta, pero suficientes poros grandes, 70% para drenar el exceso de agua y mantener las concentraciones de oxígeno necesario para la raíz, son ideales para favorecer el desarrollo y la supervivencia de plantas *ex vitro* (Cabrera, 1999; Pire y Pereira, 2003; Aguilar-Jiménez y Rodríguez-de la O, 2018). De los tres grupos de 67 plantas de *A. potatorum* micropropagadas que se transfirieron a sustrato turba-perlita (1:2) para su aclimatación en invernadero, del 84 a 90% de estas plantas sobrevivieron, y aquellas plantas que se fertirrigaron con la SN-25% fueron las más pequeñas de las que menor cantidad sobrevivió (cuadro 8). Las plantas de tamaños inferiores a 7 cm de talla y de menos de 0.51 g de peso fresco, menos cantidad de plantas sobrevivió, aunque el sustrato fuera óptimo. Aureoles-Rodríguez *et al.* (2008) mencionan que en *Agave inaequidens* Koch, las plantas menores a 4 cm y con pocas raíces, menor cantidad de plantas sobrevivió, mientras que las plantas de tamaño superior a 4 cm, todas

sobrevivieron. Es importante que las plántulas *in vitro* sean de buena calidad evaluado en cantidad y tamaño de las hojas, diámetro de tallo, volumen de raíz, características que influyen en el porcentaje de supervivencia *ex vitro*, pero también el crecimiento vigoroso de las plantas (Sánchez *et al.*, 2012). Cabrera (1999) menciona que el sustrato con turba y perlita presenta 93% de porosidad total, al combinar sustrato orgánico (turba) con inorgánico (perlita) ayuda a mejorar principalmente sus propiedades físicas y químicas, tales como capacidad de retención de agua y poros de aire. De acuerdo a Anicua-Sánchez *et al.*, (2009) y Yescas-Arreola *et al.*, (2016) la materia orgánica en el sustrato estabiliza el pH, la capacidad de intercambio catiónico y la disponibilidad de nutrimentos, mientras que la perlita aporta estabilidad para conservar entre un 77.4 y 85% de porosidad para retención de agua, pero también para aireación a las raíces.

En el presente trabajo, de las plantas micropropagadas, que durante 90 días de su aclimatación en invernadero se establecieron en sustrato turba-perlita (1:2), y recibieron solución nutritiva Steiner (1984) diluida al 50%, el 90% de éstas sobrevivió y alcanzaron tamaño mayor en la mayoría de las características morfológicas.

4.4 CONCLUSIONES

Los brotes de *Agave potatorum* que se establecieron en medio de cultivo con 0.1 a 0.5 mg L⁻¹ de AIB, del 94 a 96% formó raíces, con mejor desarrollo vegetativo, en comparación a brotes que se establecieron en medios de cultivo sin auxinas, o con ácido indolacético. Los brotes en medio de cultivo con las sales minerales al 75% de concentración hasta 92% de estos brotes formó raíces, y los brotes en el medio de cultivo con las sales minerales al 100% desarrollaron tallo de diámetro 12% y peso fresco de la parte aérea 22.9% mayores, que los brotes en medio de cultivo con las sales minerales a 75%. Del total de plantas micropropagadas que se transfirieron a sustrato turba-perlita (1:2) para su aclimatación en invernadero, transcurridos 90 días, del 84% al 90% de estas

plantas se aclimató, y mostraron crecimiento en relación a la cantidad de nutrimentos que recibieron en solución nutritiva. Las plantas fertirrigadas con la solución nutritiva al 50% de concentración de nutrimentos de la formulación Steiner presentaron mayor crecimiento en, número de hojas, diámetro del tallo, peso fresco y peso seco, en comparación a las plantas que recibieron solución nutritiva a 25%.

4.5 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. *Cultivos Tropicales*. 28(1):5-11.
- Aguilar-Jiménez, D. y J. L. Rodríguez-de la O. 2018. Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana Biotecnología*. Vol. XX No 2. 124-131. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084.
- Alvarez, C., P. Sáez, K. Sáez, M. Sanchez-Olate y D. Ríos. 2012. Effects of light and ventilation on physiological parameters during in vitro acclimatization of *Gevuina avellana* mol. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 110 (1): 93-101. DOI 10.1007/s11240-012-0133-x.
- Anicua-Sánchez, R., Ma. del C. Gutiérrez-Castorena, P. Sánchez-García, C. Ortiz-Solorio, V. H. Volke-Halle y J. E. Rubiños-Panta. 2009. Tamaño de partícula y relación micromorfológica en propiedades físicas de perlita y Zeolita. *Agricultura Técnica en México* 35(2):147-156.
- Aureoles-Rodríguez, F., J. L. Rodríguez-de la O, J. P. Legaria-Solano, J. Sahagun-Castellanos y M. G. Peña-Ortega. 2008. Propagación *in vitro* del Maguey bruto (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazadas de interés económico. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14 (3): 263-269.
- Blok C. and G. Wever. 2008. Experience with Selected Physical Methods to Characterize the Suitability of Growing Media for Plant Growth. *Acta Hort*. 779: 239- 250.
- Cabrera, R. I. 1999. Propiedades, uso y manejo de sustratos de cultivo para la producción de plantas en maceta. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5 (1): 5-11.
- Chandra, S., R. Bandopadhyay, V. Kumar and R. Chandra. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlet: from laboratory to land *Biotechnol. Lett* 32: 1199.1205.
- Colunga, G. M. P., V. D. Zizumbo y T. J. Martínez. 2007. Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a su protección legal y conservación biológica y cultural. *In: en lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. Colunga, G. M. P., Larqué, S. A., Eguiarte, L. E. y Zizumbo, V. D. (Eds.). CICY-CONACYT-CONABIO-INE. México. 229-248 pp.

- Cruz-García, H., G. V. Campos-Ángeles, J. R. Enríquez-del Valle, V. A. Velasco-Velasco y G. Rodríguez-Ortiz. 2017. Senescencia foliar en plantas micropropagadas de *Agave americana* durante su aclimatización. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 8 (2): 381-391.
- Deb, C. R. y T. Imchen. 2010. An efficient *in vitro* hardening technique of tissue culture raised plants. *Biotechnology* 9: 79-83.
- Enríquez-del Valle J. R., K.H. Antonio-Luis, G. Rodríguez- Ortiz, and G.V. Campos-Ángeles. 2016a. Effect of culture medium and incubation on the characteristics of micropropagated agave plants. *Cien. Inv. Agr.* 43(2):263-272. DOI: 10.4067/S0718-16202016000200009
- Enríquez-del Valle. J. R., S.E. Alcara-Vázquez, G. Rodríguez-Ortiz, M.E. Miguel-Luna y C. Manuel Vázquez. 2016b. Fertirriego en vivero a plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas-aclimatizadas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.7 (5): 1167-1177.
- Enríquez-del Valle J. R., I. Cruz-Valdez and G. Carrillo-Castañeda. 2012. Acclimatization of *Agave angustifolia* Haw. vitroplants in inert substrates and fertigated with different nutrimental dose. *Acta Horticulturae* 947:101-104.
- Enríquez del-Valle, J. R., A. Estrada-Silias, G. Rodríguez-Ortiz, V. A. Velasco-Velasco y G. V. Campos-Ángeles. 2013. Sustrato y dosis de fertirriego en la aclimatización de vitroplantas de *Agave americana* var. *oaxacensis*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 45 (2): 341-348.
- Enríquez-del Valle J. R. 2008. La Propagación y Crecimiento de Agaves. Fundación Produce Oaxaca A. C. e Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. México. 46 p.
- Gil-Rivero, A. E., S. E. López-Medina y A. López-Zavaleta. 2017. Aclimatación de plántulas *in vitro* de *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. (Gesneriaceae) “violeta africana” a condiciones de invernadero. *Arnaldoa* 24 (1): 343-350.
- Lesar, H., B. Hlebec, N. Ceranic, D. Kastelec y L. Luthar, 2012. Acclimatization of terrestrial orchid *Bletilla striata* Rchb.f. (Orchidaceae) propagated under *in vitro* conditions. *Acta agriculturae Slovenica*, 99 (1): 69-75.
- Luna-Luna S., J. R. Enríquez-del Valle, G. Rodríguez-Ortiz, J. C. Carrillo-Rodríguez y V. A. Velasco-Velasco. 2017. Anatomía y morfología de plantas micropropagadas-aclimatadas de *Agave potatorum* Zucc. fertirrigadas en vivero. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 40(4): 491-494.
- Martínez, M. A. y J. C. Pacheco. 2006. Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. *Agronomía Colombiana* 24(2): 207-213.
- Miguel-Luna, M. E., J. R. Enríquez-del Valle, V. A. Velasco Velasco, Y. Villegas-Aparicio, J. C. Carrillo-Rodríguez y G. Rodríguez-Ortiz. 2013. Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de *Agave*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 1151-1159.
- Monja-Mio K. M., F. Barredo P., G. Herrera H., M. Esqueda V. and M. L. Robert 2015. Development of the stomatal complex and leaf Surface of *Agave angustifolia* Haw.

- 'Bacanora' plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process. *Scientia Horticulturae* 189:32- 40. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.032>.
- Murashighe, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:573-487.
- Pérez-Molphe, E., M. J. Esparza-Araiza y M. E. Pérez-Reyes. 2012. Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. Bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35 (4): 279-287.
- Pérez-Santiago, R., J. R. Enríquez-del Valle, E. Castañeda-Hidalgo, V. A. Velasco-Velasco, G. Rodríguez-Ortiz y G. V. Campos-Ángeles. 2014. Dosis de fertirriego durante la aclimatación de plantas de *Agave americana* micropropagadas. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*. 1 (1): 20-27.
- Pire, R., Pereira, A. 2003. Propiedades físicas de componentes de sustratos de uso común en la horticultura del estado Lara, Venezuela. Propuesta metodológica. *Bioagro* 15(1):55-63.
- Reyes-Zambrano, S. J., C. A. Lecona-Guzman, F. A. Barredo-Pool, J. D. Ambrosio-Calderon, M. Abud-Archila, R. Rincon-Rosales, V. M. Ruiz-Valdiviezo y F. A. Gutiérrez-Miceli. 2016. Plant Growth regulators optimization for maximiza shoots number in *Agave americana* L. by indirect organogénesis. *Gayana Botanica*. 73(1): 124-131.
- Sánchez-Rodríguez, L. A., D. Saavedra-Hortúa y H. Mauricio-Romero. 2012. Aclimatación y endurecimiento de materiales de palma de aceite obtenidos mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales. *Revista Palmas*, 33 (4): 41-52.
- Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution, ISOSC (Proceedings). Sixth International Congress on Soilless Culture. Lunteren Wageningen. The Netherlands. 633-650 pp.
- Yescas-Arreola, E., G. V. Campos Ángeles, J. R. Enríquez del Valle, V. A. Velasco Velasco, G. Rodríguez Ortiz y J. Ruiz Luna. 2016. Aclimatación de *Agave americana* var. *Oaxacensis* obtenidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Vol.7 (4): 911-92.

CAPITULO V.

CRECIMIENTO Y TASA DE ASIMILACIÓN DE CO₂ DE *Agave potatorum* Zucc.

ABASTECIDAS A DIFERENTES NIVELES NUTRIMENTALES

[GROWTH AND RATE OF CO₂ ASSIMILATION OF *Agave potatorum* Zucc. SUPPLIED TO DIFFERENT NUTRITIONAL LEVELS]

Ariadna Ivon Bautista Castellanos^{1§}, Víctor A. González Hernández², José Raymundo Enríquez del Valle¹, Gerardo Rodríguez Ortiz¹ y Vicente Arturo Velasco Velasco¹.

¹Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Ex-Hacienda de Nazareno Xoxocotlán, Oaxaca, México. C. P. 71230. Tel: (01951) 5170788, 5170444. §Autor responsable: (baus.caste@gmail.com).

²Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, km 32.5 Carretera México-Texcoco, Estado de México, C.P. 56230, Tel: 015558045942.

RESUMEN

El maguey tobalá, *Agave potatorum*, una especie silvestre o cultivada en pequeñas extensiones, importante como materia prima para elaborar la bebida denominada como mezcal. Los agaves que superan la etapa de aclimatación se establecen en vivero y es importante aumentar las posibilidades de que las plantas sobrevivan cuando sean trasplantadas a campo abierto con abastecimiento nutrimental que influye en el tamaño del área foliar y la fotosíntesis neta. Se evaluó el crecimiento

en vivero de plantas micropropagadas-aclimatizadas durante 12 meses que recibieron dosis de fertilización diferente de dos soluciones nutritivas, y la determinación de la tasa de asimilación de CO₂ durante 24 horas. Las plantas fertirrigadas con solución California al 5% y las fertirrigadas a 100% tuvieron 20.8 y 27.7 hojas, 1031.47 cm² y 1867.37 cm² de área foliar, la roseta de 37 y 52.3 cm de diámetro, 19.5 y 29.5 cm de altura. La asimilación de CO₂ comenzó al disminuir la RFA, con la apertura estomática a las 16:00 hrs, alcanzado valores máximos de asimilación entre las 19:00 y 22:00 h. Las plantas fertirrigadas con Cal-100% y las plantas fertirrigadas con St-100% mostraron valores de asimilación de CO₂, 17 y 11 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ respectivamente.

Palabras claves: *Agave potatorum*, área foliar, fotosíntesis, micropropagación, solución nutritiva.

SUMMARY

The maguey tobalá, *Agave potatorum*, a wild species or cultivated in small areas, important as a raw material to make the drink called mezcal. Agaves that pass the acclimatization stage are established in the nursery and it is important to increase the chances that the plants will survive when they are transplanted in the open field with nutritional supply that influences the size of the leaf area and net photosynthesis. The nursery growth of micropropagated-acclimatized plants was evaluated during 12 months that received different fertilization doses of two nutrient solutions, and the determination of the CO₂ assimilation rate for 24 hours. The fertirrigadas plants with 5% California solution and the 100% fertirrigadas had 20.8 and 27.7 leaves, 1031.47 cm² and 1867.37 cm² of leaf area, the rosette of 37 and 52.3 cm in diameter, 19.5 and 29.5 cm in height. CO₂ assimilation began by decreasing the RFA, with the stomatic opening at 4:00 p.m., reaching maximum assimilation values between 7:00 p.m. and 10:00 p.m. The fertirrigadas plants with Cal

100% and the fertirrigadas plants with St-100% showed CO₂ assimilation values, 17 and 11 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ respectively.

Key words: *Agave potatorum*, leaf area, photosynthesis, micropropagation, nutritive solution.

5.1 INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Agave* son monocotiledóneas suculentas cuyo centro de origen y diversidad está localizado en México. Son especies con adaptaciones morfológicas y fisiológicas, adaptadas a ambientes áridos y semiáridos, con periodos prolongados de sequía y altas temperaturas, además de suelos de fertilidad baja (Castro, 2007; Cen-Cen, *et al.*, 2015). Estas especies tienen raíces someras y ramificadas, cutícula gruesa, tejidos suculentos, bajo número de estomas que además se encuentran hundidos y la principal adaptación es el tipo de fotosíntesis conocida como metabolismo ácido de las crasuláceas, MAC (Nobel, 1998) sus rasgos más notables son las fluctuaciones ácidas de sus tejidos durante el día y apertura estomática en la noche. Sus características anatómicas, y su comportamiento estomático particular a la fijación del CO₂ durante la noche, las plantas CAM tienen mejor utilización del agua en relación a las plantas C3 y C4.

Agave potatorum Zucc, conocida como maguey Tobalá, es una de las principales especies silvestres que se utiliza en el estado de Oaxaca para la elaboración de la bebida alcohólica destilada que se conoce como mezcal, donde es conocida como maguey Tobalá (Echeverría, 2003). Ocurre colecta intensa de ejemplares adultos, por lo que las poblaciones silvestres de esta especie han disminuido notablemente y actualmente se implementan acciones de propagación mediante semilla y cultivo. La micropropagación se ha mostrado como un sistema eficiente de multiplicación y como alternativa para propagar asexualmente a gran escala diversas especies en tiempos cortos y espacios reducidos (Monja-Mio *et al.*, 2015). Debido a que las plantas de *A. potatorum* se micropropagan

en un ambiente *in vitro*, en un medio de cultivo con disponibilidad de agua y nutrientes; iluminación artificial en intensidades de 30 a 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperaturas en el rango de 15 a 29 °C; el recipiente de cultivo cerrado en que se evita la circulación de aire y mantiene constante humedad relativa alta, de 80 a 100%, se obtienen plantas pequeñas, de 3 a 6 cm, presentan hojas delgadas, flácidas, susceptibles a la deshidratación. Cuando las plantas micropropagadas se transfieren a una etapa de aclimatación, que en el caso de los agaves puede ser de 50 a 90 días, durante los cuales se les somete a cambios graduales en condiciones ambientales; uso de sustratos de densidad baja, 0.125 a 1.6 g cm^{-3} (Abad *et al.*, 1993) de alta (80-100%) a menor (50-60%) humedad relativa; de radiación solar disminuida mediante sombra, a 400 a 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a mayor, 1500 a 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Los agaves micropropagados durante su aclimatación presentan cambios morfológicos (senescencia y muerte de varias de sus hojas formadas durante el cultivo *in vitro*, desarrollo de nuevas hojas más grandes, suculentas, rígidas) tallo engrosado (Cruz-García *et al.*, 2017). Los agaves micropropagados, que superan la etapa de aclimatación se establecen durante seis meses a 12 meses en vivero, en donde alcanzan tamaño mayor y rusticidad para su trasplante a campo (Enríquez-del Valle, 2008). Lo anterior es importante para aumentar las posibilidades de que las plantas sobrevivan cuando sean trasplantadas a campo (Vilchez *et al.*, 2015) El crecimiento de la planta ocurre mediante divisiones celulares en tejidos meristemáticos y el posterior aumento en tamaño de las células. El crecimiento requiere energía y fotosíntatos producidos en los órganos fotosintéticos, que su eficiencia es afectada por su condición nutrimental (Barceló *et al.*, 2001). Cuando un suelo no proporciona nutrientes en la cantidad suficiente que la requerida por las plantas, es necesario suministrarlo mediante un fertilizante que contenga los macros y micronutrientes (Martínez, *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el abastecimiento nutrimental influye en el tamaño del área foliar, concentración de clorofila y la fotosíntesis neta lo que influye

en la productividad (Nátr, 1992; Escalante-Estrada, 1999; Uvalle y Vélez, 2007; Enríquez-del Valle *et al.*, 2013).

Las plantas del género *Agave* han desarrollado adaptaciones a ambientes áridos y semiáridos, como son sus características anatómicas y fisiológicas les permiten una mejor utilización del agua en la relación a las plantas C3 y C4 debido a su comportamiento estomático particular y a la fijación del CO₂ durante la noche (Carrillo, *et al.*, 2014). Debido a su mayor eficiencia en el uso del agua, las plantas CAM toleran periodos prolongados de sequía.

Plantas de *A. potatorum* micropropagadas se han transferido a adaptación en invernadero y posteriormente en vivero, y en estas etapas se ha demostrado que la magnitud de crecimiento de las plantas tiene relación con el abastecimiento nutrimental (Enríquez-del Valle *et al.*, 2016; Luna-Luna *et al.*, 2017). Y en diferentes especies se ha demostrado que los niveles de crecimiento tienen relación con la actividad fotosintética (Sanclemente y Peña, 2008). Pero en *A. potatorum* se desconocen sus niveles de actividad fotosintética en relación al abastecimiento nutrimental, por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar el crecimiento en vivero de plantas micropropagadas-aclimatizadas que a partir de los 220 y hasta los 580 días de crecimiento *ex vitro* recibieron dosis de fertilización diferente de dos soluciones nutritivas, así como determinar la tasa de asimilación fotosintética de CO₂ durante 24 horas.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Material vegetal

La investigación se llevó a cabo en un vivero del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, México, ubicado en 17°04' N, 96°46' O y 1550 m, y en un invernadero del Colegio de postgraduados Campus Montecillo, ubicado en Texcoco, estado de México 19° 29' N, 98° 53' O

y 2250 m. Las plantas de *Agave potatorum* Zucc se obtuvieron *in vitro* y se aclimataron en invernadero de acuerdo al procedimiento descrito por Enríquez-del Valle, (2008). De las plantas micropropagadas-aclimatadas que tenían 220 días de crecimiento *ex vitro*, se seleccionaron 42 plantas de 10 a 13 cm de altura, las cuales fueron trasplantadas a macetas de 30 cm de diámetro y 30 cm de altura, con sustrato arena, colocándolas en vivero a la intemperie y a radiación solar plena. Las 42 plantas se separaron en seis grupos con siete plantas, cada grupo recibió dosis diferente de solución universal Steiner (1984) o solución nutritiva California (Ellis y Swaner, 1963, citado por Sánchez-del Castillo, 1989) (Cuadro 9) al 100%, 50% y 5% de concentración, con pH ajustado a 5.8. Las plantas se fertirrigaron con 400 mL a nivel sustrato dos días a la semana durante 360 días. Al iniciar el experimento y cada 60 días se registró la altura de la planta (AP): medida a partir del nivel del sustrato hasta la parte más alta de la planta; diámetro de la roseta (DR): la distancia de los extremos distales de las hojas desplegadas más grandes opuestas; número de hojas (NH) total de todas las hojas desplegadas del tallo, obteniéndose un total de seis registros. Los datos de cada variable se sometieron a análisis de varianza y comparaciones de medias (Tukey, 0.05), con el uso del programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

Cuadro 9. Compuesto químico de las soluciones nutritivas de Steiner (1984) y California (Ellis y Swaner, 1963, citado por Sánchez-del Castillo, 1989) en concentración completa (100%).

| Compuesto | Steiner=St (mg/L) | California=Cal (mg/L) |
|--|------------------------------|----------------------------------|
| Macronutrientes | | |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 49.768 | 52 |
| Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O | 107.415 | 72 |
| K(NO ₃) | 28.128 | 66 |
| K ₂ SO ₄ | 25.153 | 0 |
| KOH | 2.329 | 0 |
| KH ₂ PO | 26.95 | 0 |
| (NH ₄) ₃ PO ₄ | 0 | 12 |
| Micronutrientes | | |

| | | |
|---|-------|-------|
| MnSO ₄ | 0.62 | 0.62 |
| ZnSO ₄ | 0.11 | 0.11 |
| H ₃ BO ₃ | 0.44 | 0.44 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.020 | 0.020 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0.048 | 0.048 |

5.2.2 Área Foliar

Se cuantificó el Área Foliar (AF) mediante un método no destructivo, midiendo longitud (L) y ancho (A) de cada hoja desplegada (sin contar la espina terminal). Se calcó en papel bond el contorno de 30 hojas de diferentes tamaños. Estas calcas se recortaron y se midieron con el aparato integrador de AF óptico LI-3100 (LICOR, Inc. USA). Los datos de AF del integrador se relacionaron mediante regresión lineal con los datos de L x A, lo cual permitió determinar un factor de conversión, el cual se aplicó para estimar el AF de cada una de las hojas y el área foliar de cada planta. Los datos obtenidos del AF de las plantas se sometieron a un análisis de varianza y prueba de medias Tukey (0.05).

5.2.3 Medición de la tasa de asimilación de CO₂ y análisis estadístico

Transcurrido seis meses del experimento, 12 de las 42 plantas de *A. potatorum*, tres plantas de cada uno de los tratamientos, St-100%, St-5%, Cal-100% y Cal-5% se extrajeron de sus contenedores y a raíz desnuda se transportaron en cajas de cartón al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, en donde se establecieron en bolsas de polietileno de 25.5 cm de diámetro y 20 cm de altura, 10 dm³, con sustrato suelo-peat moss (1:2) y se colocaron en un invernadero de estructura metálica tipo túnel, con cubierta de polietileno translucido. Transcurridos 15 días del trasplante se continuó con la aplicación de las soluciones nutritivas una vez por semana. A los 30 días del trasplante, de cada planta se seleccionó una hoja de la parte media de la roseta completamente desarrollada y sana, y en la parte media de la hoja se registró la tasa de asimilación instantánea de CO₂, mediante

un IRGA portátil modelo LI 6400 (LICOR, Inc. USA), provisto con cámara de asimilación de 6 cm² y con aditamentos para regular el CO₂. El registro se hizo en intervalos cada 3 hrs durante 24 hrs iniciando a las 10:00 hrs. La tasa de asimilación instantánea de CO₂ se hizo en dos condiciones contrastantes de humedad edáfica: 1) cuando las plantas estuvieron sujetas a un régimen de riego semanal (sin restricción de agua); 2) cuando las plantas habían permanecido sin riego por 17 días, y la humedad del suelo estaba por abajo del punto de marchitez permanente PMP (condición de sequía edáfica), con base en la curva de retención de humedad del suelo del sustrato de las plantas (realizada en el Laboratorio de Física de Suelos del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo), lo que permitió conocer la capacidad de campo (85%) y el punto de marchitez permanente (60%) del sustrato. De cada registro de medición se obtuvo la tasa de asimilación de CO₂, la transpiración, la conductancia estomática, CO₂ del mesófilo (C_i) y radiación fotosintéticamente activa (RFA). El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente al azar con arreglo factorial de tratamientos 2x 2x 2x 9 (Dos niveles del factor periodo; dos niveles del factor soluciones nutritivas; dos niveles del factor concentración de las soluciones nutritivas y nueve niveles del factor horarios del registro de medición). Se obtuvieron 72 tratamientos con tres repeticiones por tratamiento, la unidad experimental fue una planta, lo que dio 216 unidades experimentales. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y comparaciones de medias (Tukey 0.05).

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Experimento: desarrollo de plantas en vivero

Se obtuvieron seis registros de medición realizadas cada dos meses en la fase de desarrollo en vivero de *Agave potatorum*, transcurridos doce meses de aplicación de las soluciones nutritivas en

sustrato arena. Los análisis estadísticos (Cuadro 10) mostraron que las formulaciones Steiner y California y dosis de fertilización diferentes a 100%, 50% y 5%, tuvieron efectos diferentes significativos ($p \leq 0.05$) en el número de hojas (NH) a los 120 días y 240 días, efectos diferentes altamente significativos ($p \leq 0.01$) en el número de hojas a los 180, 300 y 360 días, efectos diferentes significativos ($p \leq 0.05$) en el diámetro de la roseta (DR) a los 60, 240 y 300 días, y efectos diferentes altamente significativos a los 120, 180 y 360 días, efectos diferentes significativos ($p \leq 0.05$) en la altura de la planta (AP) a los 60 y 240 días y efectos diferentes altamente significativos ($p \leq 0.01$) a los 120, 180, 300 y 360 días.

Cuadro 10. Resumen del análisis de varianza de variables de *A. potatorum* en la fase de desarrollo en vivero, fertilizadas con diferentes dosis de soluciones nutritivas durante doce meses.

| Cuadros Medios y Significancia | | | | | | | |
|---------------------------------------|----|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| F.V | GL | NH60 | NH120 | NH180 | NH240 | NH300 | NH360 |
| Trat | 5 | 7.23ns | 11.58* | 43.85** | 30.90* | 56.95** | 59.75** |
| Error | 36 | 2.92 | 4.07 | 6.69 | 8.50 | 8.41 | 7.03 |
| Total | 41 | | | | | | |
| F.V | GL | DR60 | DR120 | DR180 | DR240 | DR300 | DR360 |
| Trat | 5 | 54.70* | 75.03** | 120.88** | 140.31* | 190.11* | 308.89** |
| Error | 36 | 10.56 | 11.81 | 13.84 | 30.79 | 43.21 | 33.18 |
| Total | 41 | | | | | | |
| F.V | GL | AP60 | AP120 | AP180 | AP240 | AP300 | AP360 |
| Trat | 5 | 9.47* | 17.74** | 32.04** | 51.86* | 76.11** | 105.71** |
| Error | 36 | 1.98 | 2.23 | 4.34 | 9.03 | 12.20 | 14.16 |
| Total | 41 | | | | | | |

FV= fuentes de variación; GL= grados de libertad; NH: número de hojas a los 60, 120,180, 240, 300 y 360 días; DR: diámetro de la roseta a los 60,120,180 240, 300 y 360; AP: altura de la planta a los 60, 120,180, 240, 300 y 360 *= significativo ($p > 0.05$); **= altamente significativo ($p \leq 0.01$).

En el día 60 de evaluación, las plantas en los diversos grupos tenían en promedio de 8.7 a 11.7 hojas (NH), 17.8 a 25.0 cm de diámetro de roseta (DT), 10.4 a 13.2 cm de AP, que en cada caso fueron magnitudes significativamente diferentes (Tukey 0.05) y las plantas más pequeñas fueron las que recibieron fertirriego en dilución 5%. Las plantas mostraron aumento constante en número de hojas (NH), diámetro de la roseta (DR) y altura (AP) durante los 360 días, pero el tamaño final

que alcanzaron tuvo relación positiva con la dosis de fertilización que recibieron. De tal manera que las plantas que se fertilizaron con la solución nutritiva Cal-100% tuvieron en promedio 27.7 hojas, 52.3 cm de diámetro de roseta y 29.5 cm de altura, magnitudes que fueron significativamente (Tukey 0.05) mayores a los 20.8 y 20.1 hojas, 37.0 y 34.0 cm de diámetro de roseta, 19.5 y 19.8 cm de altura que tuvieron las plantas fertirrigadas con Cal-5% y St-5% (Cuadro 11).

Plantas de *A. potatorum* que recibieron solución nutritiva St-50% de concentración mostraron mayor incremento en la altura de la planta, pero no en el número de hojas (Morales *et al.*, 2017). En la presente investigación las plantas a las que se les aplicó solución nutritiva a 100% de concentración fueron las que mostraron mayor incremento en altura y desarrollaron más hojas.

Cuadro 11. Características de plantas micropropagadas-aclimatizadas de *Agave potatorum*, en la fase de desarrollo en vivero, fertilizadas con diferentes dosis de soluciones nutritivas durante doce meses.

| SN | NH60 | NH120 | NH180 | NH240 | NH300 | NH360 |
|------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| S100 | 9.17±2.13 ab | 11.57±2.99 ab | 14.28±3.30 b | 15.85±3.53 ab | 23.14±3.48 a | 25.6±3 a |
| S50 | 10.14±1.95 ab | 12.14±2.11 ab | 15.0±3.10 ab | 15.85±3.71 ab | 21.42±2.43 ab | 24.14±1.77 ab |
| S5 | 8.71±0.75 b | 9.85±0.69 b | 12.28±0.95 b | 13.42±2.07 b | 18.42±3.20 b | 20.14±2.28 b |
| C100 | 11.71±1.38 a | 13.57±2.14 a | 19.14±3.18 a | 19.42±2.76 a | 25.71±2.21 a | 27.7±2.56 a |
| C50 | 9.85±2.26 ab | 11.42±2.07 ab | 15.28±2.36 ab | 17.28±2.56 ab | 22.71±2.98 ab | 25.2±2.6 a |
| C5 | 9.28±1.25 ab | 10.57±1.27 ab | 12.42±1.71 b | 14.57±2.50 b | 18.42±2.87 b | 20.8±2.4 b |
| | DR60 | DR120 | DR180 | DR240 | DR300 | DR360 |
| S100 | 22.6±3.7 abc | 25.5±3.9 abc | 30.8±5.2 ab | 34.8±5.3 ab | 40.7±5 ab | 45.4±6.6 ab |
| S50 | 25.0±3.05 a | 28.92±2.68 a | 34.64±2.39 a | 35.92±7.06 ab | 40.71±5.70 ab | 45.14±4.87 ab |
| S5 | 17.85±1.67 c | 20.42±1.81 c | 25.0±2.38 b | 27.42±4.11 b | 32.28±10.27 b | 34.0±5.83 c |
| C100 | 24.14±0.89 ab | 28.57±1.81 ab | 34.57±2.69 a | 38.71±5.02 a | 46.00±4.39 a | 52.3±4.8 a |
| C50 | 23.71±5.12 ab | 26.85±5.49 ab | 33.21±4.65 a | 36.14±6.89 ab | 40.78±7.07 ab | 45.42±6.57 ab |
| C5 | 19.71±3.14 bc | 23.28±3.35bc | 26.57±3.90 b | 28.85±4.05 b | 33.28±5.15 b | 37.00±5.56 bc |
| | AP60 | AP120 | AP180 | AP240 | AP300 | AP360 |
| S100 | 12.14±1.57 ab | 14.85±1.95 a | 16.71±2.62 abc | 19.35±4.06 ab | 22.42±4.50 ab | 25.85±4.87 ab |
| S50 | 13.0±1.0 a | 15.42±0.78 a | 17.21±1.07 ab | 19.14±1.77 ab | 21.28±2.98 ab | 24.85±2.30 abc |
| S5 | 10.42±0.78 b | 12.28±0.90 b | 13.71±1.38 c | 15.28±1.70 b | 17.71±2.69 b | 19.85±3.18 bc |
| C100 | 13.28±0.75 a | 16.14±1.34 a | 19.42±2.14 a | 22.71±3.35 a | 25.92±3.74 a | 29.5±4.35 a |
| C50 | 12.0±2.08 ab | 13.78±2.03 ab | 15.78±2.91 bc | 18.71±3.77 ab | 22.57±3.69 ab | 26.0±3.41 a |
| C5 | 10.71±1.70 b | 12.42±1.48 b | 14.00±1.73 bc | 15.71±2.48 b | 17.14±3.02 b | 19.57±3.86 c |

SN: solución nutritiva; S: Steiner; C: california; NH: número de hojas a los 60, 120,180, 240, 300 y 360 días; DR: diámetro de la roseta a los 60,120,180 240, 300 y 360; AP: altura de la planta a los 60, 120,180, 240, 300 y 360. Medias con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente (p ≤ 0.05).

5.3.2 Tasa de asimilación de CO₂

En un periodo de 24 hrs los nueve registros en intervalos cada tres horas (10:00 am, 1:00 pm, 4:00 pm, 7:00 pm, 10:00 pm, 1:00 am, 4:00 am, 7:00 am y 10:00) de la tasa de asimilación de CO₂ en plantas de *A. potatorum*, en la primera y segunda fecha. La radiación fotosintéticamente activa (RFA) presentó el valor máximo (900 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) a las 13:00 hrs, disminuyendo en las siguientes horas hasta llegar a cero en el intervalo de las 19:00 h. La figura 10 muestra que las plantas sometidas a las diversas formulaciones y diluciones de soluciones nutritivas, iniciaron la tasa de asimilación de CO₂ con la apertura estomática a partir de las 16:00 h, cuando la RFA era de 300 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, e incrementando los valores positivos de asimilación de CO₂ al continuar disminuyendo la RFA hasta oscuridad total. Ocurrió asimilación de CO₂ durante todo el periodo nocturno, alcanzado valores máximos entre las 19:00 y 22:00 hrs, y cesando la asimilación aproximadamente a las 09:00 h cuando la RFA era de 200 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La figura 1 muestra que en condiciones de agua disponible las plantas de *A. potatorum* continuaron mostrando el mecanismo CAM, de asimilación nocturna de CO₂. También se observa que las plantas que recibieron fertirriego con Cal-100% mostraron valores mayores de asimilación de CO₂ (17 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) mientras que las plantas fertirrigadas con St-100% que tuvieron valor máximo de 11 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Sánchez-Mendoza, (2010) menciona que en *Agave angustifolia* con riego se obtuvieron valores positivos a partir de las 14:00 h, debido tal vez al efecto del riego que pudo permitir la tasa de asimilación aún con presencia de luz. Cuando la conservación de agua no es fundamental para los agaves, es decir, cuando sus condiciones son favorables, la mayoría de estas plantas toman el CO₂ a través de los estomas abiertos durante el día, sin embargo, la conservación del agua es una de las ventajas ecológicas y agronómicas potenciales más importantes de estas

plantas, pues almacenan grandes volúmenes de agua en relación con sus superficies foliares (Nobel, 1998).

Tendencias similares se observaron en las plantas durante el periodo que se limitó durante 17 días el abastecimiento de agua y el sustrato estuvo por debajo del punto de marchites permanente (Figura 10), mostrando que las plantas de *A. potatorum* continúan asimilando CO₂, probablemente debido a que esta especie presenta metabolismo ácido crasuláceo CAM, que tuvieron disponible agua almacenada en sus tejidos suculentos (Nobel, 1998).

Los niveles de asimilación de CO₂ son importantes para la acumulación de biomasa (Jarma *et al.*, 2005; Cruz-Huerta *et al.*, 2005). Sin embargo, no se observaron grandes diferencias de asimilación de CO₂ por unidad de área similares, entre las plantas fertirrigadas a 100% y las fertirrigadas a 5%. Pero las plantas que fueron abastecidas con Cal-100% tuvieron 1867.37 cm² de área foliar que las plantas fertirrigadas con Cal-5% al tener 1031.47 cm². Entonces, un factor que podría explicar las diferencias de acumulación de biomasa, entre plantas que recibieron alta y plantas que recibieron baja dosis de fertilización, es el tamaño de área foliar que desarrollaron, así mismo para las plantas fertirrigadas con solución St-100% y St-5% al tener 1504.55 y 1005.6, respectivamente.

En el presente trabajo, las plantas fertirrigadas con la solución Cal-100% y las plantas fertirrigadas con Cal-5% de concentración presentaron mayores tasas de asimilación de CO₂ que las plantas fertirrigadas con la solución Steiner. La tasa de asimilación de CO₂ fue disminuyendo en el registro del intervalo de la 1:00 pm, hasta el cierre estomático que ocurrió a las 8:00 am pues presentó valores negativos. Pimienta-Barros, *et al.* (2006) en *Agave tequilana* obtuvo mayores valores de asimilación de CO₂ positiva en la noche oscilando en promedio entre 7.5 y 16.2 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹ ya que de 10 a.m. a 4 p.m., observó tasas negativas de asimilación en sus registros de medición.

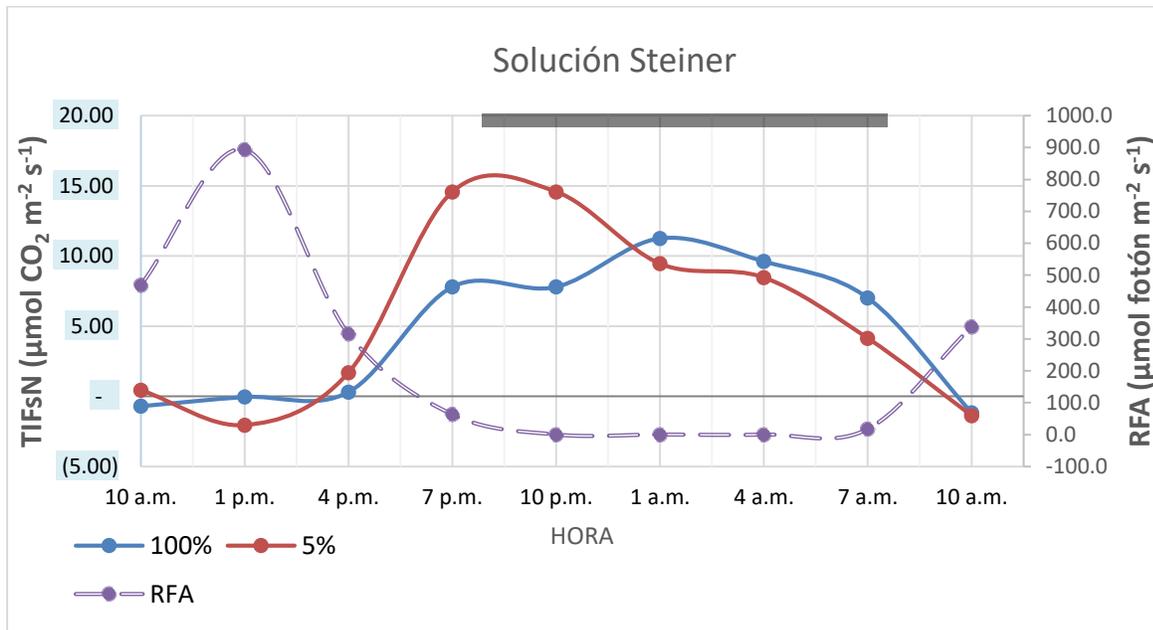
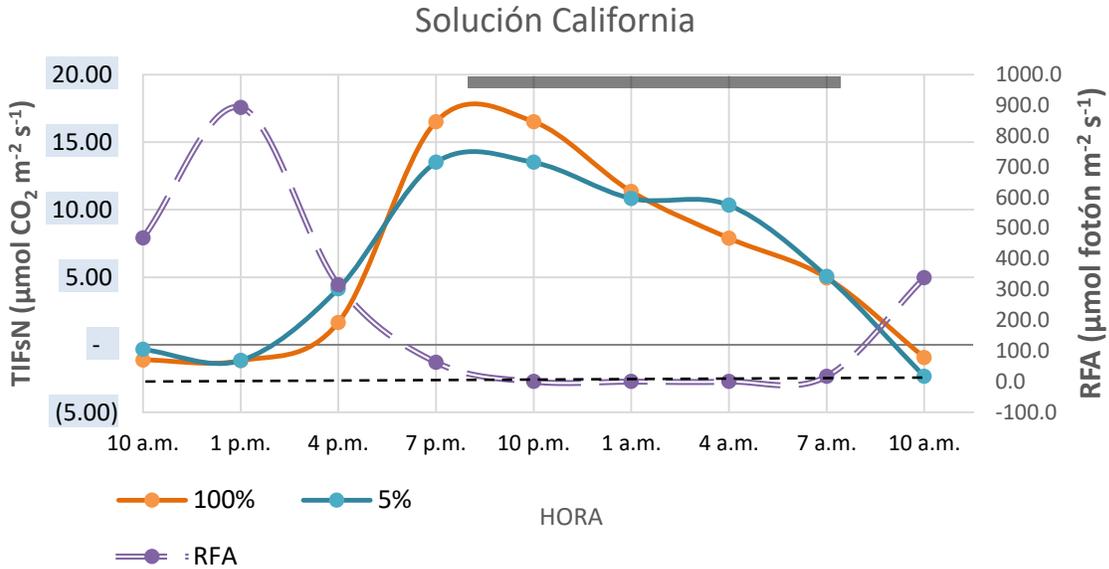


Figura 10. Gráficas de la de tasa fotosintética instantánea neta (TIFsN) de plantas micropropagadas-aclimatizadas de *A. potatozum*, fertirrigadas con diferentes dosis de concentración de soluciones nutritivas (California y Steiner). La medición de TIFsN en el periodo en que el suelo tuvo humedad por arriba del punto de marchitez permanente. La barra horizontal color gris representa el periodo nocturno desde la puesta del sol a las 20:13 h hasta el amanecer a las 7:11 en horario de verano.

Cuando las plantas estuvieron sometidas a limitación de humedad en el suelo, (Figura 11) al omitir el riego de las soluciones nutritivas por 17 días, la tasa de asimilación de CO₂ en las plantas que habían sido fertirrigadas con la solución nutritiva Cal-100 y las plantas que recibieron Cal-5% a diferencia de la primera medición, se registró con la apertura estomática en el intervalo de las 19:00 hrs mostrando los valores más altos en el intervalo de las 22:00 hrs con promedios de 17.81 y 18.41 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ respectivamente. Así mismo las plantas que se fertirrigaron con la solución Cal-100 y Cal-5% presentaron valores más altos en la tasa de asimilación de CO₂ que las plantas fertirrigadas con la solución St-100 y las plantas que recibieron St-5%. Pimientos-Barros *et al.* (2005) pone de manifiesto el metabolismo CAM, donde debido a las condiciones poco favorables (poca humedad en el suelo) se reduce la actividad fotosintética e incremento la respiración, lo que es similar en la presente investigación con *A. potatorum* al comenzar la apertura estomática en el intervalo de las 19:00 hrs, sin embargo, la poca humedad del suelo no afectó la tasa de asimilación de CO₂. Patishtán *et al.* (2010) en plantas de sábila (*Aloe vera*) reportan que la suspensión del riego provocó que las plantas redujeran la conductancia estomática, el cierre estomático se atribuyó al estrés hídrico al que se sometió la planta. Sánchez-Mendoza (2010) describe que, en *Agave angustifolia*, los valores más altos de asimilación de CO₂ ocurrieron durante el intervalo de las 19:00 a la 01:00 h. Al igual que en *Agave tequilana*, Pimienta *et al.* (2006), reporta que son plantas que resisten condiciones extremas de sequía con poco efecto en la asimilación de CO₂. Uvalle y Velz (2007) en *Agave tequilana* Wever var. Azul, mencionan que las plantas a las que se someten a un abastecimiento nutrimental mediante ferti riegos, aumenta su capacidad fotosintética para la fijación de CO₂ y la acumulación de biomasa.

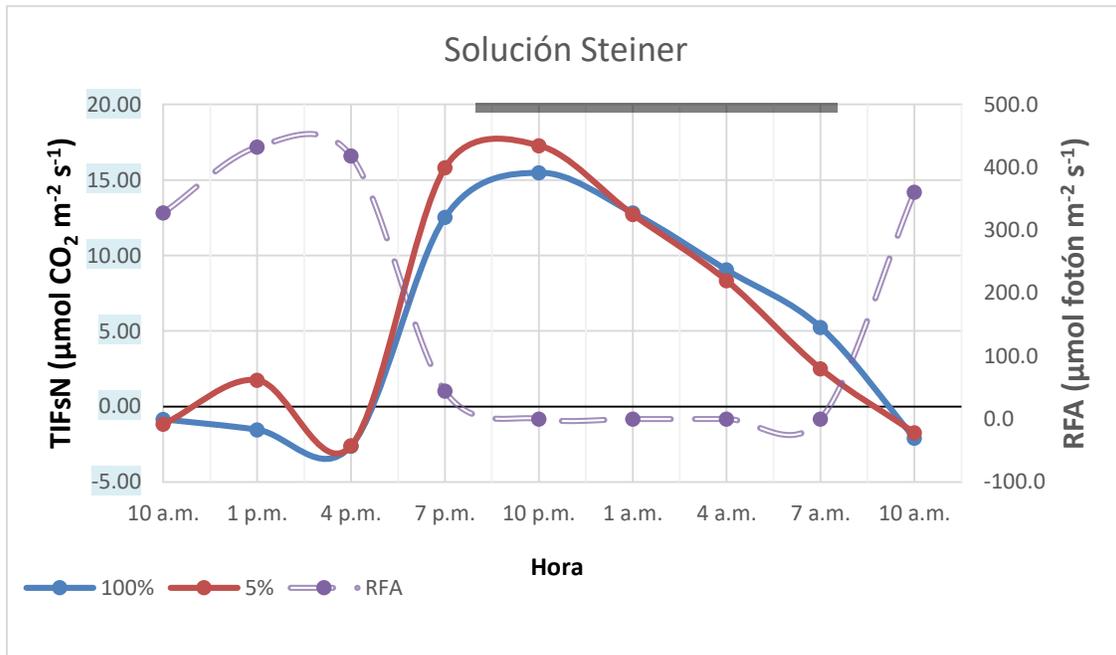
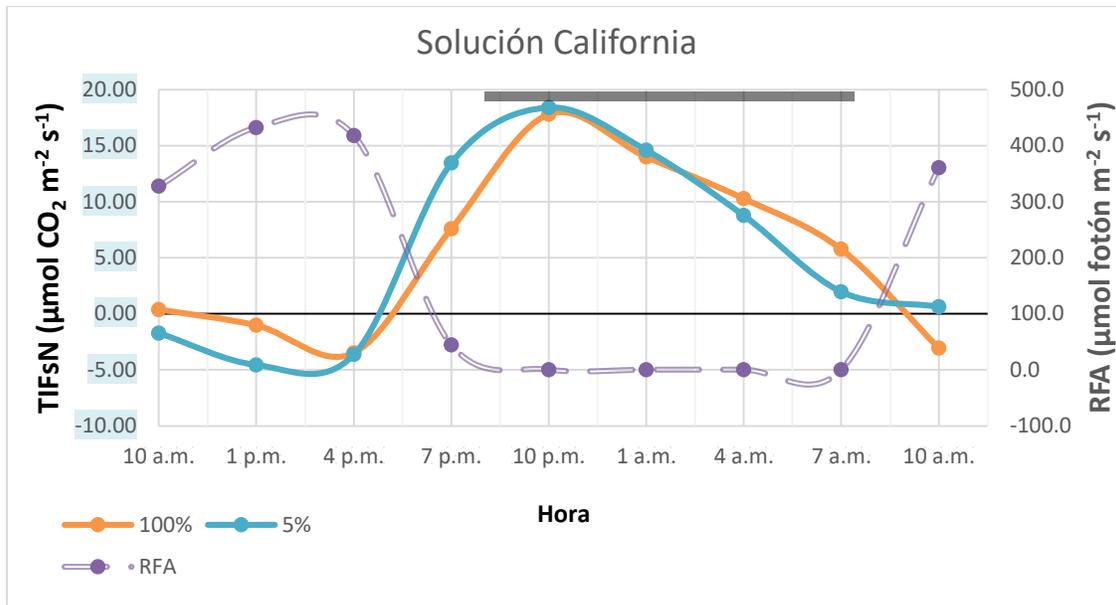


Figura 11. Gráficas de la de tasa fotosintética instantánea neta (TIFsN) de plantas micropropagadas-aclimatizadas de *A. potatozum*, fertirrigadas con diferentes dosis de concentración de soluciones nutritivas (California y Steiner). La medición de TIFsN en el periodo en que el suelo tuvo humedad por debajo del punto de marchitez permanente. La barra horizontal color gris representa el periodo nocturno desde la puesta del sol a las 20:13 h hasta el amanecer a las 7:11 h en horario de verano.

5.3.3 Análisis estadísticos del área foliar y la tasa de asimilación de CO₂

El AF es una medida necesaria para evaluar la intensidad de asimilación de las plantas, parámetro de gran relevancia cuando se efectúa el análisis de crecimiento de un cultivo (Ruiz-Espinoza, *et al.*, 2007). Al ordenar los datos de AF en relación a los periodos con o sin riego, plantas de *A. potatorum* durante el primer periodo tuvieron 1053.5 cm² de AF, y posteriormente cuando las plantas habían sido expuestas a 17 días de limitación de agua, éstas tenían 1221.4 cm² de AF, significativamente (Tukey 0.05) más que en el periodo anterior. Lo que muestra que periodos cortos de limitación de agua en el suelo no afectan la capacidad de crecimiento de esta especie de agave (Cuadros 12 y 13). Al ordenar los datos en relación al tipo de solución nutritiva aplicada a las plantas, se observa que aquellas plantas fertirrigadas con la formulación Steiner y las fertirrigadas con solución California tuvieron 1030.5 y 1234.9 cm² de AF, respectivamente, magnitudes significativamente diferentes (Tukey 0.05). Al ordenar los datos en relación a la concentración de nutrimentos en solución nutritiva que recibieron las plantas, aquellas plantas que recibieron Cal-100% o St-100%, tuvieron en promedio 1407.2 cm² de AF, magnitud 1.62 veces, y significativamente diferente (Tukey, 0.05) a los 867.2 cm² de AF que tuvieron las plantas fertirrigadas con Cal-5% o St-5%.

Los análisis de varianza (Cuadro 12) mostraron que el periodo en el que hicieron las mediciones con y sin riego tuvieron efectos altamente significativos ($p \leq 0.01$) en el tipo de solución nutritiva. Las concentraciones de las soluciones tuvieron efectos altamente significativos ($p \leq 0.01$) en la conductancia estomática, la radiación fotosintéticamente activa, efectos significativos ($p \leq 0.05$) en la transpiración. Los horarios de registro de las mediciones tuvieron efectos altamente significativos ($p \leq 0.01$) en la fotosíntesis, en la transpiración, conductancia estomática y en la

RFA. La interacción del periodo de riego con el horario de registro tuvo efectos altamente significativos ($p \leq 0.01$) en la fotosíntesis, transpiración, conductancia estomática y la RFA.

Cuadro 12. Resumen de varios análisis de varianza, para AF, la tasa de asimilación de CO₂ de plantas de *A. potatorum* fertilizadas con diferentes dosis de soluciones nutritivas.

| Cuadros Medios y Significancia | | | | | | |
|--------------------------------|-----|---|---------------|----------|----------------------|-----------------------|
| F.V | GL | ACO ₂ ($\mu\text{mol CO}_2$ $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) | Trans | Cond | CO ₂ (Ci) | AF (cm ²) |
| Trat | 71 | 137.8** | 0.000001** | 0.014** | 27818612ns | 282600.14** |
| Per | 1 | 0.96ns | 0.0000005ns | 0.036ns | 71465771.9ns | 1532586.20** |
| SN | 1 | 4.52ns | 0.0000002ns | 0.0035ns | 61521904.0ns | 2459140.23** |
| Conc | 1 | 4.98ns | 0.000022* | 0.045** | 90175268.0ns | 15750132.90** |
| Hora | 8 | 1123.3** | 0.000090** | 0.051** | 34789727.8ns | 0.00ns |
| Per*SN | 1 | 16.21ns | 0.000001ns | 0.0001ns | 9743163.4ns | 4642.95ns |
| Per*Conc | 1 | 0.14ns | 0.0000004ns | 0.019** | 15241053.0ns | 209183.39ns |
| Per*Hora | 8 | 38.36** | 0.000027** | 0.025** | 28593932.8ns | 0.00 |
| SN*Conc | 1 | 2.54ns | 0.00000003ns | 0.0009ns | 38915432.0ns | 103277.93ns |
| SN*Hora | 8 | 6.18ns | 0.00000016ns | 0.0015ns | 18419468.7ns | 0.00ns |
| Con*Hora | 8 | 14.6ns | 0.00000013 | 0.013** | 27630158.1ns | 0.00ns |
| Per*SN*Conc | 1 | 0.26ns | 0.00000001ns | 0.0004ns | 20051583.9ns | 5646.26ns |
| Per*SN*Hora | 8 | 12.2ns | 0.000000022ns | 0.0011ns | 25781151.7ns | 0.00ns |
| SN*Conc*Hora | 8 | 4.98ns | 0.000000023ns | 0.0022* | 15078401.8ns | 0.00ns |
| Per*SN*Conc*Hora | 16 | 10.05ns | 0.000000022ns | 0.0076** | 29104032.3ns | 0.00ns |
| Error | 144 | 9.71 | 0.0000002 | 0.146 | 35821589 | 83123.06 |
| Total | 215 | 11187.4 | 0.0001 | 1.145 | 7133430170 | 32034330.94 |

FV= fuentes de variación; GL= grados de libertad; ACO₂: asimilación de CO₂; Trans: Transpiración; Cond: conductancia estomática; RFA: radiación fotosintéticamente activa; CO₂: dióxido de carbono del mesófilo; AF: área foliar; * = significativo ($p > 0.05$); ** = altamente significativo ($p \leq 0.01$).

Cuando las plantas tuvieron agua fácilmente disponible y cuando la humedad del suelo estuvo abajo del PMP, presentaron 0.036 y 0.062 unidades en conductancia estomática, en RFA 223.3 y 176 $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Cuadro 13). Las plantas a las que se aplicaron soluciones nutritivas al 100% y 5% presentaron 0.0007 y 0.0009 unidades en transpiración, 0.03 y 0.06 en conductancia estomática y en área foliar con 1407.2 y 867.2 cm², magnitudes que en cada caso fueron significativamente diferentes (Tukey 0.05). El horario de registro de las nueve mediciones tuvo diferencias significativas en la mayoría de las variables registradas.

Cuadro 13. Características de la tasa de asimilación de CO₂ de plantas micropropagadas-aclimatizadas de *Agave potatorum*, en la fase de desarrollo en vivero, fertilizadas con diferentes dosis de soluciones nutritivas durante doce meses.

| Factores | ACO ₂ (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) | Trans | Cond (g) mmol m ⁻² s ⁻¹ | CO ₂ (Ci) | AF (cm ²) |
|-------------------|---|----------------|--|----------------------|-----------------------|
| Per | | | | | |
| con R | 5.60a | 0.0009a | 0.036b | 257.4a | 1053b |
| sin R | 5.47a | 0.0008a | 0.062a | 1407.8a | 1221.4a |
| SN | | | | | |
| St | 5.39a | 0.0008a | 0.04a | 1366.3a | 1030.5b |
| Cal | 5.68a | 0.0009a | 0.05a | 298.9a | 1234.9a |
| Conc | | | | | |
| 100 | 5.39a | 0.0007b | 0.03b | 186.5a | 1407.2a |
| 5 | 5.69a | 0.0009a | 0.06a | 1478.7a | 867.2b |
| Hora (hrs) | | | | | |
| 10:00 | -0.63e | 0.0004de | 0.01b | 521a | 1137.2a |
| 13:00 | -1.22e | 0.0001de | 0.005b | 516a | 1137.2a |
| 14:00 | -0.56e | 0.0006bc | 0.01b | 1872a | 1137.2a |
| 19:00 | 12.72ab | 0.002a | 0.08a | 157a | 1137.2a |
| 22:00 | 15.29a | 0.001bc | 0.09a | -13a | 1137.2a |
| 01:00 | 12.72b | 0.001bc | 0.10 | 116a | 1137.2a |
| 04:00 | 9.09c | 0.001b | 0.11a | 294a | 1137.2a |
| 07:00 | 4.58d | 0.0009bc | 0.011b | 350a | 1137.2a |
| 10:00 | -1.50e | 0.0002e | 0.01b | 3681a | 1137.2a |

Per= periodo; conR= con riego; sinR= sin riego; SN= solución nutritiva; St= Steiner; Cal= California; Conc= concentración; ACO₂= asimilación de CO₂; Trans= Transpiración; Cond= conductancia estomática; RFA= radiación fotosintéticamente activa; CO₂= dióxido de carbono del mesófilo; AF= área foliar. Medias con la misma letra en cada columna y factor no son diferentes estadísticamente (p ≤ 0.05).

5.4 CONCLUSIONES

Al fertirrigar las plantas de *A. potatorum* durante 360 días, aquellas plantas que recibieron la solución nutritiva California al 100%, presentaron tamaño mayor, con 27.7 hojas, 52.3 cm de diámetro de roseta y 29.5 cm de altura, en comparación con las plantas fertirrigadas con la solución Steiner al 100%. Las plantas desarrollaron área foliar mayor en relación positiva a la cantidad de nutrientes que recibieron en fertirriego. Las plantas de *A. potatorum* muestran asimilación de CO₂ al disminuir la RFA, comenzó la apertura estomática en el horario de las 16:00 hrs, alcanzado valores máximos de asimilación entre las 19:00 y 22:00 h. Las plantas que recibieron fertirriego

con Cal-100% mostraron valores mayores de asimilación de CO₂ (17 μmol CO₂ m⁻² s⁻¹). Durante el periodo en que el contenido de humedad del sustrato estuvo debajo del punto de marchites permanente no afectó la tasa de asimilación de CO₂ de las plantas.

5.5 LITERATURA CITADA

- Barcélo-Coll, J., G. Nicolás-Rodrigo, B. Sabater-García y R. Sánchez-Tamés. 2001. Características generales del crecimiento. En: Barcélo-Coll, J., Nicolás-Rodrigo, G., Sabater-García, B., Sánchez-Tamés, R. (Eds) Fisiología vegetal. Pirámide. Madrid, España. Pp. 295-306.
- Carrillo-Hernández, M. A., A. L. Viguera y L. Portillo. 2014. Observaciones sobre el comportamiento de estomas en plantas suculentas. Boletín Nakari 25(2): 27-30.
- Castro, B. 2007. Manual para la producción y paquete tecnológico para agave. Secretaria de Desarrollo Rural del estado de Puebla. México. Pp. 1-13.
- Cen-Cen, E., F. Gómez-Merino y A. Martínez-Hernández. 2015. Tolerancia de *Agave Tequilana* a altas concentraciones de cationes metálicos divalentes. Polibotánica 40: 163-182.
- Cruz-García, H., G. V. Campos-Ángeles, J. R. Enríquez-del Valle, V. A. Velasco-Velasco y G. Rodríguez-Ortiz. 2017. Senescencia foliar en plantas micropropagadas de *Agave americana* durante su aclimatización. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 8 (2): 381-391.
- Cruz-Huerta, N., J. F. Ortiz-Cereceres, F. Sánchez del Castillo y M. del C. Mendoza-Castillo. 2005. Biomasa e índices fisiológicos en chile morrón cultivado en altas densidades. Revista Fitotecnia Mexicana. 28(3): 287-293.
- Echeverría, Y. 2003. Aspectos etnobotánicos y ecológicos de los recursos vegetales en las comunidades Mixtecas de San Pedro Nodón y San Pedro Jocotipac, Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, México.
- Enríquez-del Valle J. R. 2008. La Propagación y Crecimiento de Agaves. Fundación Produce Oaxaca A. C. e Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. México. 46 p.
- Enríquez del-Valle, J. R., A. Estrada-Silias, G. Rodríguez-Ortiz, V. A. Velasco-Velasco y G. V. Campos-Ángeles. 2013. Sustrato y dosis de fertirriego en la aclimatización de vitroplantas de *Agave americana* var. *oaxacensis*. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. 45 (2): 341-348.
- Enríquez-del Valle. J. R., S.E. Alcará-Vázquez, G. Rodríguez-Ortiz, M.E. Miguel-Luna y C. Manuel Vázquez. 2016b. Fertirriego en vivero a plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas-aclimatizadas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas Vol.7 (5): 1167-1177.
- Escalante-Estrada, J. A. 1999. Área foliar, senescencia y rendimiento del girasol de humedad residual en función del nitrógeno. Terra 17: 149-157.

- Jarma, A., T. Rengifo y H. Araméndiz-Tatis. 2005. Aspectos fisiológicos de estevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) en el Caribe colombiano: I. Efecto de la radiación incidente sobre el área foliar y la distribución de biomasa. *Agronomía Colombiana*. 23 (2): 207-216.
- Martínez, M. L. Velasco, V. V. A.; Ruiz, L. J. Enríquez, V. J. R. Campos, Á. G. V. y L. M. L. Montaña. 2013. Efecto del nitrato de calcio y sustratos en el rendimiento del tomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6:1176.
- Monja-Mio K. M., F. Barredo P., G. Herrera H., M. Esqueda V. and M. L. Robert 2015. Development of the stomatal complex and leaf Surface of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora' plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process. *Scientia Horticulturae* 189:32- 40. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.032>.
- Morales, I., G. A. Martínez-Gutiérrez, C. I. Cortés-Martínez, T. Aquino-Bolaños, C. Escamirosa-Tinoco y M. Hernández-Tolentino. 2017. Crecimiento de *Agave potatorum* cultivado en ambientes contrastantes y fertirrigación. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*. 4 (2): 18-27.
- Nobel P.S. 1998. Los Incomparables Agaves y Cactus. Editorial Trillas. México, D.F. Pp: 5-162.
- Luna-Luna S., J. R. Enríquez-del Valle, G. Rodríguez-Ortiz, J. C. Carrillo-Rodríguez y V. A. Velasco-Velasco. 2017. Anatomía y morfología de plantas micropropagadas-aclimatadas de *Agave potatorum* Zucc. fertirrigadas en vivero. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 40(4): 491-494.
- Nátr L. 1992. Mineral nutrients-a ubiquitous stress factor for photosynthesis. *PHOTOSYNTHETICA*. 27(3): 271-294
- Patishtán, P.J., Rodríguez, G. R., Zavala, G.F. y C.D. Jasso. 2010. Conductancia estomática y asimilación neta de CO₂ en Sábila (*Aloe vera* Tourn) bajo sequía. *Revista Fitotecnia Mexicana* Vol. 33 (4): 305-314
- Pimienta-Barrios, E., J. Zañudo-Hernández, P. Nobel y García-Galindo, J. 2005. Respuesta fisiológica a factores ambientales del agave azul (*Agave tequilana* Weber). *Scientia - CUCBA* 7(2):85-97.
- Pimienta-Barrios, E., J. Zañudo-Hernández y J. García-Galindo. 2006. Fotosíntesis estacional en plantas jóvenes de *Agave tequilana*. *Agrociencia* 40: 699-709.
- Ruiz-Espinoza, F. H., B. Murillo-Amador, J. L. García-Hernández, E. Troyo-Diéquez, A. Palacios-Espinoza, A. Beltrán-Morales, L. Fenech-Larios, S. Zamora-Salgado y P. Marrero-Labrador. 2007. Mediciones lineales en la hoja para la estimación no destructiva del área foliar en albahaca (*Ocimum basilicum* L.). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 13(1): 29-34.
- Sánchez-del Castillo, F. 1989. Hidroponia. Autónoma Chapingo. México D.F. Pp. 194.
- Sánchez-Mendoza, S. 2010. Tención de humedad del suelo y efectos de fertilizantes de liberación lenta en maguey mezcalero (*Agave Angustifolia* Haw.). Tesis de Maestría en Ciencias, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Unidad Oaxaca. México. 73 p.

- Sancllemente, M. A. y E. J. Peña. 2008. Crecimiento y eficiencia fotosintética de *Ludwigia decurrens* Walter (ONAGRACEAE) bajo diferentes concentraciones de nitrógeno. *Acta Biológica Colombiana*. 13 (1): 175-185.
- 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.
- Uvalle, B. J. X. y G. C. Vélez. 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*
- Vilchez, J., Martínez, L. y N. Albany. 2015. Comparación del crecimiento en vivero entre plántulas y vitroplantas de guayabo cultivar enana roja cubana Eae-1840. *Interciencia*, 40(4): 270-274.

CAPITULO VI.

CONCLUSIONES GENERALES

Se logró la propagación *in vitro* de *Agave potatorum* Zucc., en todas las etapas que conlleva la técnica, a partir de la germinación de semillas en el medio de cultivo. Es importante la generación de protocolos para cada genotipo de agave, por lo que sus niveles de respuesta dependen las procedencias puesto que se expresan en diferente grado a la concentración de las citocininas y de las sales minerales. Durante la etapa de multiplicación de propágulos (Experimento 1), los cultivos formaron más brotes al disminuir a 75% la concentración de sales minerales MS y conforme se incrementó la concentración de Bencilaminopurina hasta 3 mg L⁻¹. La kinetina fue de efecto leve en la mayoría de las variables evaluadas. Dos procedencias de *A. potatorum* mostraron diferencias en nivel de respuesta de proliferación y tamaño de brotes, en condiciones similares de cultivo *in vitro*.

Durante la etapa de enraizado de brotes (Experimento 2), los brotes que se establecieron en medio de cultivo con 0.1 a 0.5 mg L⁻¹ de AIB, mostraron mejor

respuesta y desarrollo vegetativo, en comparación a brotes que se establecieron en medios de cultivo sin auxinas, o con ácido indolacético. En el experimento 3, de aclimatación en invernadero de plantas micropropagadas, del total de plantas que se transfirieron a sustrato turba- perlita (2:1), a los 90 días el 87% de estas plantas se aclimató, y mostraron crecimiento en relación a la cantidad de nutrimentos que recibieron en solución nutritiva. Las plantas fertirrigadas con la solución nutritiva al 50% de concentración de nutrimentos de la formulación Steiner, mostraron mayor crecimiento, mayor número de hojas, diámetro del tallo, peso fresco y peso seco, en comparación a las plantas que recibieron solución nutritiva a 25%.

En la fase de desarrollo en vivero las plantas de *A. potatozum* fertirrigadas con la solución nutritiva California al 100% al término de los 12 meses de evaluación, presentaron mayor efecto en el desarrollo de las hojas con 27.7, un diámetro de 52.3 cm y altura de 29.5 cm en comparación con las plantas a las que se aplicó la solución Steiner al 100%. Por lo tanto, el área foliar fue mayor en la concentración al 100% que en la del 5% de la solución nutritiva California. La tasa de asimilación de CO₂ al disminuir la RFA, comenzó la apertura estomática en el horario de las 16:00 hrs, alcanzado valores máximos de asimilación entre las 19:00 y 22:00 h. Las plantas que recibieron fertirriego con Cal-100% mostraron valores mayores de asimilación de CO₂ (17 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) que las plantas fertirrigadas con St-100% que tuvieron valor máximo de 11 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

CAPITULO VII.

RECOMENDACIONES

-Hacer buena selección de la planta madre con mejores características de la que se desee obtener planta en cultivo *in vitro*.

-Desarrollar otras metodologías donde se prueben dosis de concentración más altas de AIB en el enraizado de brotes, reduciendo el porcentaje de las sales minerales.

-En aclimatación en invernadero, evitar los sustratos que no tengan buen drenaje de agua, así mismo buena porosidad, ya que hará que la planta no logre su supervivencia.

-El área de aclimatación debe contar con buenas instalaciones, para que la planta pueda desarrollarse.

-Hacer las mediciones de la tasa de asimilación de CO₂ en campo abierto, y compararlas en las condiciones de invernadero.

CAPITULO VIII.

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Dugua, X. y L. E. Eguiarte. 2013. Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in México. *Journal of Arid Environments* (90): 36-44.
- Álvarez, V. M. 2011. Biotecnología y la multiplicación de plantas. Universidad Nacional de Quilmes. Editorial Albatros SACI. Impreso en Gráfica Pinter S. A. Buenos Aires-Argentina. 96 p.
- Cabrera, C. A., O. Flores, M. Cesar, P. I. Castro y Q. I. Zúñiga. 2003. Auxinas endógenas, AIA-oxidasa y enraizamiento en *Vigna radiata* L. wilczek inducido por auxina exógena libre y conjugada. *Revista Fitotecnia Mexicana*. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. Chapingo, México. Pp. 61-66.
- Calva-Calva, G. y J. Pérez-Vargas. 2005. Cultivo de células y tejido vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista Digital Universitaria* 6(11):1-16.
- Domínguez-Rosales, M. S., Ma. L. González-Jiménez, C. Rosales-Gómez, C. Quiñones-Valles, S. D. Díaz-de León, S. J. Mireles-Ordaz y E. P. Molphe-Balch. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia de la universidad autónoma de Aguascalientes*.41:53-62.
- Enríquez-del Valle J. R., K.H. Antonio-Luis, G. Rodríguez- Ortiz, and G.V. Campos-Ángeles. 2016. Effect of culture medium and incubation on the

- characteristics of micropropagated agave plants. *Cien. Inv. Agr.* 43(2):263-272.
DOI: 10.4067/S0718-16202016000200009
- Enríquez- del Valle J. R. 2008. La Propagación y Crecimiento de Agaves. Fundación Produce Oaxaca A. C. e Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. México. 46 p.
- Espinosa-Barrera, L. A. 2015. Generalidades e importancia de los agaves en México. *Herbario CICY* 7:161-164.
- García Mendoza, A. 1998. Con sabor a Maguey. Guía de la colección nacional de Agaváceas y Nolináceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología-UNAM. Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM. México, D. F.
- García-Mendoza A. J. 2004. Agavaceas. En: García-Mendoza, A. J., Ordoñez, M. J., Briones-Salas (eds.). M. Biodiversidad de Oaxaca. REDACTA, S.A de C.V. México D.F. p. 154.
- García-Mendoza A. J. 2010. Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* zucc. (agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta Botánica Mexicana*, núm. 91. Instituto de Ecología, A.C. México pp. 71-93.
- Gentry A. H. 1982. Patterns of neotropical plant species diversity. *Evolutionary Biology* 15: 670 p.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. The thechnology. Exegetics Ltd. England. New Jersey, USA. pp. 13-20.
- Hartmann, T. y D. E. Kester. 2003. Propagación de plantas. Compañía Editorial Continental, S. A. de C. V. Impreso en México. Pp 593-608.
- Herppich W. y K. Peckmann. 2000. Influence of Drought on Mitochondrial Activity, Photosynthesis, Nocturnal Acid Accumulation and Water Relations in the CAM Plants *Prenia sladeniana* (me-type) and *Crassula lycopodioides* (pepck-type). *Ann Bot.*;86:611-620.
- Howell, S., Lall S. and P. Che. 2003. Cytokinins and shoot development. *Trends Plant Science* 8: 453-459.
- Hurtado, M. y M. Manzanares. 1987. Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Trillas. Cornell University. 232p.
- Illsey, G. C.; A. T. Gómez; G. Rivera; M. M. del P. Morales; B. J. García; S. A. Ojeda; R. M. Calzada y N. S. Mancilla. 2005. Conservación in situ y manejo campesino de magueyes mezcaleros. Grupo de Estudios Ambientales A. C. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. V028. México D. F.

- Jordan, M. y J. Casaretto. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. Fisiología Vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, Chile. pp. 27.
- Kehie, M., S. Kumaria y P. Tandon. 2012. In vitro plantlet regeneration from nodal segments and shoot tips of *Casium chinese* Jacq. Cv. Naga King Chili. 3 Biotech. Mar; 2(1): 31-35. doi 10.1007/s13205-011-0025-5.
- Kolendo, J., 2000, The Agave, a plant and its story. Ed. Philippe Faveon, Inglaterra.
- Ludwig, J. y J. Cohen. 2002. Identification and quantification of three active auxins in different tissues of *Tropaeolum majus*. Physiologia Plantarum 115: 320–329.
- LÜTTGE U. 2002. CO₂-Concentrating: Consequences in Crassulacean Acid Metabolism. J. Exp Bot.;53:2131-2142.
- Martínez, I. 2012. Gastronomía y Tradición en México. VI. El Tequila y el mezcal. México.
- Martínez-Ramírez, S., S. A. Trinidad, S. G. Bautista y S. E. C Pedro. 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.
- Mathur, J. y C. Koncz. 2005. Callus and culture regeneration. Methods in molecular biology: Arabidopsis Protocols. Humana Press Inc., Totowa, NJ. P. 82
- Monja-Mio K. M., F. Barredo P., G. Herrera H., M. Esqueda V. and M. L. Robert 2015. Development of the stomatal complex and leaf Surface of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora' plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process. *Scientia Horticulturae* 189:32- 40. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.032>.
- Montes-Cruz, S., J. M. Lalama-Aguiree, J. M. Echeverría-Félix y S. M. Salazar-Torres. 2016. Factores bióticos y abióticos que influyen en la aclimatación de las vitroplantas en invernadero. Dominio de las Ciencias, 2: 63-89.
- Murashige, T. 1974. Plant Propagation through Tissue Cultures. Annual Review of Plant Physiology, 25, 135-166.
- Nobel P.S. 1998. Los Incomparables Agaves y Cactus. Editorial Trillas. México, D.F. Pp: 5-162.
- Pérez-Molphe, E., M. J. Esparza-Araiza y M. E. Pérez-Reyes. 2012. Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. Bajo condiciones de crecimiento retardado. Revista Fitotecnia Mexicana. 35 (4): 279-287.

- Peter, H., R. F. Raven, S y E. Evert. 1992. Biología de las plantas. Volumen II. Editorial Reverte. P 292.
- Pierik, R. 1990 (b) *In vitro* culture of higher plants. Holland, Kluwer Academic publisher. pp 149-152.
- Ramírez-Malagón, R., A. Borodanenko, L. Pérez-Moreno, M. D. Salas-Araiza, H. G. Nulez-Planus y N. Ochoa-Alejo. 2008. *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 94:201-207.
- Scheinvar, G. E. 2008. Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave potatorum*. Tesis de maestría. Instituto de Ecología, UNAM. 109 p.
- Smith, M. K. and R. A. Drew. 1990. Growth and yield characteristics of dwarf off-types recovered from tissue-cultured bananas. *Aust. J. Exp. Agric.* pp. 575-578.
- Torres, I., A. Casas, A. Delgado-Lemus y S. Rangel-Landa. 2013. Aprovechamiento, demografía y establecimiento de *Agave potatorum* en el Valle de Tehuacán, México: Aportes ecológicos y etnobiológicos para su manejo sustentable. *Zonas Áridas.* 15 (1): 92-109.