



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

ACLIMATACION DE PLANTAS OBTENIDAS  
*IN VITRO* DE *Agave tequilana* WEBER CV. AZUL

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**I N G E N I E R O      A G R I C O L A**

**P R E S E N T A :**

**MIGUEL      ANGEL      BARRERA      REYES**

ASESOR: M.C. JUAN ROBERTO GUERRERO AGAMA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES

**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle a usted que revisamos la TESIS:

" Aclimatación de Plantas Obtenidas in vitro de Agave  
tequilana Weber cv. azul".

que presenta el pasante: Miguel Angel Barrera Reyes  
con número de cuenta: 9362007-9 para obtener el título de  
Ingeniero Agrícola

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuatitlán Izcalli, Méx. a 26 de abril de 2006

PRESIDENTE	<u>M.C. Francisco Cruz Pizarro</u>	
VOCAL	<u>Ing. Aurelio Valdéz López</u>	
SECRETARIO	<u>M.C. Juan Roberto Guerrero Agama</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Ing. Gustavo Mercado Mancera</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Biol. Ma. Victoria Hernández Pimentel</u>	

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte de ella.*

*A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y muy en especial a la Carrera de Ingeniería Agrícola por la formación académica.*

*Al M.C. J. Roberto Guerrero Agama que además de compartir sus experiencias y conocimientos me brindo su amistad.*

*Al M.C. Francisco Cruz Pizarro, por la confianza y consejos que siempre ha tenida bien a darme.*

*Al M.C. Teofilo Muñoz Cabrera, Ing. Fernando Moreno Lara, Ing. José Luis Navarrete Noriega, Sra. Catalina Moreno por el soporte y colaboración que siempre me brindaron.*

*A los profesores de la carrera de Ingeniería Agrícola que contribuyeron a mi formación académica y en especial al Ing. Aurelio Valdés López, Ing. Gustavo Mercado Mancera y a la Biol. Ma. Victoria Hernández Pimente que integraron parte de mi jurado.*

*A todos mis compañeros de la gloriosa generación 18ava por todas las experiencias compartidas.*

*Al Ing. Jorge Blancas Álvarez y Sr. Rolando Figueroa por impulso y apoyo.*

## DEDICATORIAS

*A mis Padres Patrocinia Reyes Ramírez y J. Guadalupe Barrera Godoy gracias por todo el amor y haber engendrado en mí la lucha por lograr lo que uno quiere y jamás claudicar.*

*A mis Hermanas Cata, Carmen, Emilia, Eva, Lupe, Elvira, Raquel y Lydia por la confianza.*

*A mis sobrinos y familiares que siempre estuvieron al pendiente del desarrollo de mi formación.*

*A Susana Cruz Basilio Sánchez por el impulso y amor que siempre me brindo.*

## INDICE

Índice de cuadros .....	i
Índice de gráficas .....	ii
Resumen .....	iii
	Pag.
Introducción .....	1
II. Objetivos e hipótesis .....	3
III. Revisión de Literatura	
3.1. Propagación de agavaceae .....	4
3.1.1. Sexual .....	4
3.1.2. Asexual .....	4
Rizomas .....	5
Apomixis vegetativa .....	5
Cultivo de tejidos .....	5
3.2. Cultivo de tejidos en Agavaceae .....	6
3.2.1. Investigación en el cultivo <i>in vitro</i> del género <i>Agave</i> .....	6
3.2.2. El cultivo de tejidos en <i>Agave tequilana</i> .....	10
3.3. Factores que inciden en la Aclimatación .....	11
3.3.1. Luz .....	12
3.3.2. Humedad .....	14
3.3.3. Temperatura .....	17
3.3.4. Sustratos .....	18
3.3.5. Nutrición .....	21
3.4. Características de las plantas propagadas <i>in vitro</i> .....	22
IV. Materiales y Métodos .....	23
4.1. Ubicación .....	23

4.2. Material vegetativo .....	23
4.3. Características del área de investigación .....	23
4.3.1. Sustratos .....	24
4.3.2. Luz .....	24
4.3.3. Humedad Relativa .....	25
4.4. Manejo Agronómico .....	26
4.4.1. Transplante .....	26
4.4.2. Riego .....	26
4.4.3. Control Fitosanitario .....	26
4.5. Diseño experimental .....	27
4.5.1. Tratamientos .....	27
4.5.2. Variables de estudio. ....	28
Número de hojas .....	28
Longitud de hoja .....	28
Longitud de raíz .....	28
Volumen de planta .....	29
Análisis estadístico .....	29
V. Resultados y Discusión.....	30
5.1. Número de hojas.....	30
5.2. Longitud de hoja .....	35
5.3. Volumen de planta .....	38
5.4. Longitud de raíz .....	40
VI. Conclusiones .....	44
LITERATURA CITADA.....	45
Anexos .....	55

## INDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Investigación sobre el cultivo <i>in vitro</i> del familia Agavaceae. ....	7
Cuadro 2. Manejo de la intensidad lumínica durante la fase de aclimatación de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. azul obtenido <i>in vitro</i> con diferentes proporciones N-P-K. ....	24
Cuadro 3. Manejo de la humedad relativa y temperatura durante la fase de aclimatación de <i>A. tequilana</i> Weber cv. azul obtenido <i>in vitro</i> con diferentes proporciones N-P-K. ....	25
Cuadro 4. Tratamientos durante la fase de aclimatación de <i>A. tequilana</i> Weber cv. azul obtenido <i>in vitro</i> con diferentes proporción N-P-K. ....	27
Cuadro 5. Diferencias de las variables número de hojas, longitud de planta, volumen de planta y longitud de raíz, en plantas con diferente dosis de N-P-K durante la aclimatación de <i>Agave tequilana</i> obtenidas <i>in vitro</i> a las 12 semanas después del trasplante .....	31
Cuadro 6. Correlación de la variables número de hojas, longitud de planta, volumen de planta y longitud de raíz de plantas de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. azul, obtenida <i>in vitro</i> , durante la fase de aclimatación a las 12 semanas después del trasplante. ....	43

## INDICE DE GRÁFICAS

	Pag.
Grafica 1. Crecimiento relativo del número de hojas de <i>Agave tequilana</i> Weber cv. Azul obtenidas <i>in vitro</i> , durante la fase de aclimatación a las 12 semanas después del trasplante. ....	34
Grafica 2. Número de hojas neoformadas en las plantas de <i>Agave tequilana</i> Weber cv azul, obtenidas <i>in vitro</i> , sometida a diferentes niveles de N-P-K durante la fase de aclimatación a las 12 semanas después del trasplante. ....	35
Gráfica 3. Incremento final para la variable longitud de hoja de plantas <i>Agave tequilana</i> Weber cv azul, obtenidas <i>in vitro</i> , durante la fase de aclimatación a las 12 semanas después del trasplante. ....	37
Gráfica 4. Crecimiento Relativo de longitud de hoja en plantas de <i>Agave tequilana</i> Weber cv azul, , durante la fase de aclimatación a las 12 semanas después del trasplante. ....	38
Gráfica 5. Incremento de volumen en las plantas de <i>Agave tequilana</i> Weber cv azul, obtenidas <i>in vitro</i> durante la fase de aclimatación a las 12 semanas después del trasplante. ....	40
Gráfica 6 Crecimiento de longitud de raíz en plantas de <i>Agave tequilana</i> Weber cv azul, obtenidas <i>in vitro</i> , durante la fase de aclimatación a las 12 semanas después del trasplante. ....	41

## RESUMEN

El Tequila es una bebida alcohólica resultado de la fermentación y destilación de la planta de *Agave tequilana* cv. azul, genuina, de alta calidad y con denominación de origen, de gran demanda, no solamente en nuestro país, sino en el extranjero ocupa actualmente el segundo lugar en participaciones de el mercado de bebidas alcohólicas después del Brandy.

Pero en los últimos 10 años la planta de *Agave tequilana* cv. azul, ha manifestando serias amenazas de producción, lo cual es debido a diversos factores como problemas nutrimentales y fitosanitarios, aunado la necesidad de incrementar la producción para abastecer un mercado que va en aumento. Esto último se vuelve un problema mayor al buscar alternativas de regiones productoras acordes a los requerimientos de la planta y especialmente a la mínima producción de material vegetativo para la producción en campo, lo cual se agudiza por las formas naturales que presenta en general todo el género *Agave*. Ante estas amenazas, la biotecnología a través de la micropropagación es una forma viable para la obtención de plantas de buena calidad y en gran número.

En general los trabajos realizados en aclimatación de plantas obtenidas por cultivo de tejidos tomando en cuenta solo los factores ambientales, (luz, temperatura y humedad), sin considerar que las plantas proceden ambiente rico en nutrimentos.

Por tanto, el presente trabajo, establece el criterio de conformar un medio de aclimatación ideal, en el cual no solo se contemple las condiciones atmosféricas en las que se desarrolla la planta, sino darle un sustento nutrimental, que en forma pasiva pueda ser integrado al sistema de la planta y con ello disminuir el estrés durante dicha fase, para asegura su supervivencia, así como el arraigo de las plantas en el medio natural.

Para ello se evaluaron diferentes concentraciones N-P-K, en el crecimiento de plantas obtenidas *in vitro* y el comportamiento morfométrico, para determinar la mejor concentración de N-P-K, de acuerdo a las respuestas que presentaron las mismas.

En donde nitrógeno se emplearon 1, 2, 3 y 4 meq L<sup>-1</sup>, para el fósforo fue de 0.15, 0.30, 0.45 y 0.60 meq L<sup>-1</sup> y las dosis de potasio fueron de 0.66, 1.32, 1.98 y 2.64 meq L<sup>-1</sup>.

## INTRODUCCIÓN

La importancia del Agave para México es incuestionable, debido a la tradición que se tiene en nuestro país de la fabricación de bebidas alcohólicas derivados de él como el pulque, el mezcal y el tequila, este último a incrementado su fama a nivel internacional, generando una creciente industria con alto potencial económico tanto a industriales como a productores agrícolas.

El tequila es una bebida alcohólica resultado de la fermentación y destilación de la planta de *Agave tequilana* cv. azul, originaria del estado de Jalisco y que actualmente se produce en los estados de Nayarit, Guanajuato, Michoacán y Tamaulipas, de acuerdo a la denominación de origen en México, sin embargo, la industria tequilera se encuentra en una crisis debido a un desabasto de la materia prima, aunado a una problemática fitosanitaria que afecta a las plantas del Agave, esto ha originado una disminución en la producción de tequila llevando consigo un incremento en los precios de la bebida en los mercados nacionales e internacionales, lo anterior se ha reflejado en el crecimiento acelerado de la industria tequilera, volviéndose contra el sector que no estaba preparado para soportar más de 500 marcas en el mercado (Consejo Regulador del Tequila, 2000). Además que de enero a marzo de 2003, se produjo una disminución del 7% con respecto al mismo periodo del año 2002, pasando de 35.3 millones de litros de tequila a 32.9 millones, lo cual a provocado que del total del tequila fabricado en el primer trimestre del año, solo 10.1 millones correspondiera a tequila 100 % de Agave y 22.8 millones de litros, de tequila mixto (51% de Agave y 49% de otros azúcares). Esta baja en la producción de tequila 100% puro, se ha mantenido durante los últimos 3 años.

Por tanto se ha generado la necesidad de encontrar métodos que incrementen el número de plantas en los campos de cultivo y la apertura de nuevas zonas de producción, pues el método tradicional de plantaciones por hijuelos del Agave, resulta insuficiente por la alta demanda de plantas y el tiempo que se requiere para poder ser explotada, por lo que es necesario contar con mecanismos de multiplicación masiva más rápidos. De tal forma, la biotecnología, puede permitir la

generación de altos volúmenes de materia prima, por lo que la micropropagación ha permitido dar un gran paso, en la obtención de plantas de buena calidad y en mayor número, además que se pretende obtener mediante los viveros de Agave micropropagado una reducción del ciclo de maduración de la planta, la cual tarda normalmente ocho o nueve años antes de llegar a las destilerías para ser procesada y convertida en tequila (Téllez, 2003).

Sin embargo, el éxito de la propagación *in vitro*, está basado en el comportamiento de las plantas en las zonas de producción, por tanto es la fase de aclimatación quien determina la cristalización de plantas aptas para ser transferidas a condiciones naturales (Hartman y Kester, 1997), en virtud que se presentan condiciones que pueden provocar la pérdida del material vegetativo obtenido *in vitro*. De tal forma, se maneja, sistemáticamente la variación gradual de los factores que inciden en el crecimiento de las vitroplantas para lograr características que lleven a la planta de una condición "heterótrofa" a condiciones normales como planta "autótrofa". En este punto las plantas obtenidas por cultivo de tejidos son, por lo general manejadas bajo control de condiciones ambientales, (luz, temperatura y humedad), sin considerar que son sometidas a un ambiente rico en nutrimentos, los cuales se encuentran a disposición sin que las plantas tengan un desgaste en la absorción de elementos que son necesarios para la realización de los procesos fisiológicos inherentes a su crecimiento (Guerrero, 2000).

Por tanto, el presente trabajo, establece el criterio de conformar un medio de aclimatación ideal, en el cual no solo se contemple las condiciones atmosféricas en las que se desarrolla la planta, sino darle un sustento nutrimental, que en forma pasiva pueda ser integrado al sistema de la planta y con ello disminuir el estrés durante dicha fase, para asegura su supervivencia, así como el arraigo de las plantas en el medio natural, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos e hipótesis.

## II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### General

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones N-P-K, en el crecimiento de plantas de *Agave tequilana* Weber cv. azul, obtenidas *in vitro*, durante la fase de aclimatación.

### Particulares

Analizar el comportamiento morfométrico que presentan las plantas de *A. tequilana* por la aplicación de solución nutritiva, con respecto a las que no se les realiza ningún aporte nutrimental.

Determinar la mejor concentración de N-P-K, de acuerdo a las respuestas que presenten las plantas.

## HIPÓTESIS

En general, las plantas requieren de un abasto nutrimental para tener un desarrollo óptimo durante las etapas fenológicas, por tanto, al aportar nutrimentos durante la fase de aclimatación de plantas de *Agave tequilana* cv. azul, obtenidas *in vitro*, se favorecerá la formación y desarrollo de nuevos órganos (hojas, tallo y raíz) y se evitará un estrés por el cambio de ambiente, aumentando su supervivencia y arraigo.

### III. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Propagación de agavaceae.

En general, existen dos tipos básicos de propagación en las plantas del género agave, la forma sexual y la asexual, las cuales producen nuevos organismos a partir de semillas, tallos, hojas y/o raíces (Hartmann, 1997).

##### 3.1.1. Sexual.

La reproducción sexual de las plantas se inicia con la diferenciación las flores en el esporofito maduro, en ellas se produce la fase esporofita y gametofita, que una vez realizada la fecundación conduce a la formación del cigoto y desarrollo del embrión correspondiente, dando origen a un individuo de la misma especie (Parker, 2000).

En el *Agave tequilana*, la producción de semillas es aproximadamente de 6000 semillas por planta, sin embargo, a pesar de la gran cantidad que se produce, se presentan algunos problemas importantes como son: bajos porcentajes de germinación, variabilidad genética, el crecimiento y la maduración es heterogénea; haciendo que el ciclo del cultivo se extienda y por ende su explotación (Granados, 1993).

##### 3.1.2. Asexual.

La multiplicación asexual es una producción de plantas a partir de partes vegetativas, utilizando órganos y/o tejidos vegetativos que conserven la potencialidad de multiplicación y diferenciación celular para generar órganos a partir de cúmulos celulares presentes en el material utilizado. Este tipo de propagación tiene esencialmente tres variantes, que son: 1) La propagación a partir de rizomas, 2) Apomixis vegetativa, y 3) la micropropagación por cultivo *in vitro* (Valenzuela1994).

Las dos primeras formas de propagación se dan de forma natural y la tercera se induce artificialmente.

### **Rizomas**

La multiplicación a través de rizomas es común en la generalidad de los agaves, los cuales son una estructura especializada para la división y/o separación. Es un tallo lateral etiolado, el cual crece plagiotrópicamente, con las hojas pequeñas; los rizomas emergen del tallo principal y son inducidos acrópetamente (Hartmann et al., 1997).

El agave puede producir rizomas a partir del tercer año de ser plantado, sin embargo hasta el cuarto año tienen la calidad suficiente para realizar nuevas plantaciones (ASERCA. 2000).

### **Apomixis vegetativa**

Se define como la producción de semillas sin fecundación, es el proceso de formación de un embrión dentro de un óvulo de las plantas que producen flores, es decir que en lugar de que ocurra la producción de la flor se producen en el mismo sitio estructuras vegetativas proveniente de tejido ovárico diploide (Hartmann et al., 1997), la floración es necesaria para que esto se produzca.

### **Cultivo de tejidos**

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas que permiten producir nuevas plantas en un medio nutritivo artificial, en condiciones asépticas, con temperatura y luz controladas, a partir de pequeñas porciones de plantas, denominadas explantes, tales como embriones, semillas, tallos, ápices, hojas, células individuales, meristemos y granos de polen (Hughes, 1980; Lozoya, 1985;

Margara, 1988; Pierik, 1990). Estas técnicas se basan en la totipotencia celular, la cual se define como la capacidad potencial de una célula somática para generar una planta igual a la que le dio origen (George y Sherrington, 1984). No obstante, se debe tener en cuenta que dicha propiedad disminuye progresivamente, conforme avanza el grado de diferenciación de las células.

### **3.2. Cultivo de tejidos en Agavaceae**

El avance de la biotecnología ha cumplido un papel importante en el desarrollo de las técnicas del cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos. El cultivo de tejidos vegetales, o bien la propagación clonal por cultivo *in vitro*, constituye uno de los métodos que mayores logros ha aportado al desarrollo de una nueva agricultura, permitiendo la obtención de cultivares libres de agentes patógenos, incluyendo virus, así como la conservación de germoplasma, entre otras expectativas (Rubluo, 1993), gracias al mantenimiento prolongado de cultivos en mínimo crecimiento y la crío conservación de tejidos.

#### **3.2.1. Investigación en el cultivo *in vitro* del género Agave**

La investigación en el género Agave, no es nuevo y desde la década de los 70's, se han realizado trabajos de Cultivo de Tejidos Vegetales de plantas del género Agave. Para *Agave tequilana*, esto ha sido relevante durante la última década, a causa del aumento en la demanda del tequila

En el Cuadro 1, se presenta en forma sintética, los estudios más comunes que se han realizado desde el año 1975 a la fecha.

**Cuadro 1.** Investigación sobre cultivo *in vitro* de la familia Agavaceae.

ASPECTO	EXPLANTE	MEDIO UTILIZADO	RESULTADOS
Micropropagación de <i>Cordyline terminalis</i> L. (Kunisaki, 1975).	Selección de ápices de brotes preestablecidos asépticamente en medios sin hormonas.	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Brotos múltiples, rizo génesis.
Inducción de callos en distintas especies de <i>Agave</i> (Groenewald et al; 1977)	Fragmentos de semillas.	L S modificado (ác. Benzoico, tirosina, caseína y 2,4-D)	Brotos múltiples, rizo génesis.
Propagación de <i>Cordyline terminalis</i> a partir de callos (Mee, 1978).	Selección de ápices de brotes.	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Brotos múltiples, rizo génesis.
Estudio de las condiciones de cultivo de células de <i>Yucca pilifera</i> y su cuantificación de sarsasapogenina (Quintero et al;1980)	Fragmentos de coléoptilos y hojas de plántulas preestablecidas asépticamente.	Murashige y Skoog modificado (ANA o 2,4-D y BA)	Obtención de saposgeninas.
Propagación <i>in vitro</i> de <i>Dracaena marginata</i> tricolor (Chua, et al;1981)	Selección de tallos incluyendo nudos y entrenudos.	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Callos, Brotos múltiples, rizo génesis.
Propagación <i>in vitro</i> de henequén <i>Agave froucroydes</i> Lem. (Madrigal, et al; 1981)	Yemas axilares de tallo, hijuelos, rizomas e inflorescencias, así como selección de tejidos del tallo y de las hojas jóvenes.	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Callos, Brotos, rizo génesis
Propagación <i>in vitro</i> de <i>Sansevieria trifasciata</i> (Blazich y Novitzky, 1984)	Fragmentos de hoja de la mitad superior del tallo.	Murashige y Skoog modificado (ANA o 2,4-D y BA)	Inducción de meristemos, brotes, rizo génesis.
Morfogénesis <i>in vitro</i> de <i>Yucca schidigera</i> (McCarthy y Staba, 1985)	Selección de hipocótilo.	Murashige y Skoog modificado (ANA o 2,4-D y BA)	Foto morfogénesis

Continuación Cuadro 1. Investigación...

Efecto de la composición del medio en la propagación <i>in vitro</i> y desarrollo <i>in vivo</i> de <i>Cordyline terminalis</i> (Evalddelson y Welander, 1995)	Brotes axilares (2,4mm)	Murashige y Skoog al 50%. ANA y BA	Brotes múltiples, rizo génesis
Propagación <i>in vivo</i> de mezcal tequilero <i>Agave tequilana</i> Weber( Gracián-Sandoval y Cruz, 1987)	Ápices de brotes	Murashige y Skoog al 100% y 50%. ANA y BA	Brotes múltiples, rizo génesis.
Propagación <i>in vitro</i> de <i>Agave fourcroydes</i> (Robert et al., 1987)	Sección de tejido de rizoma y tallo	Murashige y Skoog modificado ( ANA o 2,4-D y BA)	Formación de brotes a partir de rizomas
<i>Agave tequilana in vitro</i> un modelo para el estudio de morfogénesis ( Nava, 1988)	Sección de tallos.	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Formación de callos y brotes.
Propagación <i>in vitro</i> <i>Agave arizonica</i> Gentry & Weber( Powers y Backhaus, 1989)	Bulbillos, segmentos basales de hojas	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Formación de callos y brotes múltiples.
Actividad de la Glutamato dehidrogenasa en plantas normales y vitrificadas de <i>Agave tequilana</i> Weber propagadas <i>in vitro</i> (Castro-Concha et.al., 1990)	Segmentos de tallo.	Murashige y Skoog modificado ( ANA o 2,4-D y BA)	Formación de callos, brotes y rizo génesis.
Rápida propagación de <i>Agave cantala</i> , <i>A. fourcroydes</i> y <i>A. sisalana</i> por cultivo <i>in vitro</i> ( Binh et al., 1990)	Segmentos de tallo, diferentes secciones.	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Formación de callos, brotes y rizo génesis
Micropropagación de <i>Agave sisalana</i> (Das, 1992)	Segmentos de tejido de rizoma y brotes laterales	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Formación de brotes a partir de rizomas y rizo génesis

## Continuación Cuadro 1. Investigación...

Influencia de los agentes gelificantes en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>Cordyline</i> , <i>Rosa</i> y <i>homalomena</i> (Podwyszynska y Olsewski, 1995)	Brotes obtenidos <i>in vitro</i> .	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Brotes múltiples, rizo génesis.
Embriogénesis de <i>Agave victoriana-reginae</i> Moore (Rodríguez-Garay et al., 1996)	Hojas.	Murashige y Skoog modificado (ANA o 2,4-D y BA)	Inducción de meristemos y rizo génesis
Alta frecuencia en la regeneración de brotes de <i>Agave sisalana</i> (Nikam, 1997)	Segmentos de tallos de bulbillos y tallos	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Formación de callos, brotes y rizo génesis
Micropropagación y establecimiento de <i>Yucca aloifolia</i> (Atta-Allay Van, 1997)	Brotes obtenidos <i>in vitro</i> .	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Brotes múltiples, rizo génesis.
Propagación eficiente <i>in vitro</i> de <i>Agave Parrasana</i> Berger (Santacruz-Ruvalcaba et al. 1999)	Semillas	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Formación de callos, brotes y rizo génesis
Interacción de los iones en la producción de sapogenina esteroides contenidos en cultivos de callos de <i>Agave amaniensis</i> Inv. Farmacéutica (Adrijany et al. 1999)	Callos cultivados.	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Brotes múltiples, rizo génesis.

Continuación Cuadro 1. Investigación...

Asimilación de iones de cobre en suspensión celular en el cultivo <i>Agave amaniensis</i> y su efecto en el desarrollo y contenido de aminoácidos. Inv. Farmacéutica (Kartosentono et al. 2002)	Callos.		Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Brotes múltiples, rizo génesis.
Regeneración vía organogénesis de plantas de sisal <i>Agave sisalana</i> (Hazra et al., 2002)	Segmentos de rizoma.	de	Murashige y Skoog (1962) ANA y BA	Brotes múltiples, rizo génesis.

Fuente: Elaboración personal.

### 3.2.2. El cultivo de tejidos en *Agave tequilana*.

Debido a la crisis en la que se encuentra inmersa la industria tequilera, se buscan mecanismos para subsanar la problemática, por lo cual se iniciaron programas encaminados a la investigación y desarrollo en apoyo a la cadena productiva *Agave-tequila*, contando para ello con los principales centros de investigación del país, siendo uno de los de mayor importancia el CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica del Estado de Jalisco).

De hecho, existen diversos trabajos realizados sobre biotecnología básica y de aplicación inmediata, consistentes en producir plantas de *Agave* completas, a partir de una sola célula, por diferentes métodos y posteriormente aprovechar esa tecnología para el mejoramiento genético de la planta, como el realizados por Santacruz-Ruvalcaba, (1997), quien obtuvo plantas de *Agave tequilana* Weber, a través de embriogénesis somática. Trabajos similares fueron realizados por Portillo

(1997), pero analizó auxinas en la embriogénesis somática, encontrando resultados similares a los reportados por Santacruz (1997)

Por otra parte, Vélez (1997) realizó estudios para la obtención de plantas libres de patógenos causantes de los mayores problemas en el *Agave tequilana* Weber cv azul, en las regiones de Tequila y Los Altos de Jalisco, tales como bacterias (*Erwinia* sp) y hongos como *Fusarium oxysporum*, para ello, pusieron en contacto células de Agave y algunas preparaciones elaboradas con la bacteria y el hongo respectivamente, de tal forma obtuvo células vivas y sanas, con la capacidad de formar plantas, realizando posteriormente propagación *in vitro*. Con base en lo obtenido por Velez, Rodríguez-Garay (1997), realizó clonación masiva *in vitro* de *Agave tequilana* Weber cv.azul, obteniendo plantas libres de dichos patógenos.

Recientemente, Téllez (2003), desarrollo trabajos para la propagación masiva de *Agave tequilana* Weber cv azul, con diferentes proporciones de  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  en el medio de cultivo, encontrando que una relación de  $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$  3.5:1, produce mayor cantidad de brotes y no se presentó problemas de vitrificación.

En ninguno de los trabajos realizados, tanto de agaveceas en general, como en *A. tequilana* en particular, se presentó estudios sobre la fase de aclimatación.

### 3.3. Factores que inciden en la aclimatación.

La aclimatación es una fase inmediata al cultivo *in vitro*, en donde las vitroplantas son conducidas para establecerlas o transplantarlas a condiciones *ex vitro*, para su paulatina adaptación a condiciones naturales de los factores que inciden en ella como luz, humedad y temperatura, de lo cual dependerá la supervivencia de las plantas (Preece y Sutter, 1991).

### 3.3.1. Luz

Las características de radiación lumínica que influyen en el desarrollo de las plantas en general son clasificadas en intensidad, calidad y longitud, en el período diario de exposición (Pierik, 1990).

Durante la fase de aclimatación se debe considerar la intensidad de luz a la que estuvo sometida la planta *in vitro*, la cual es menor a la del medio externo, teniendo un cambio de  $56 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  en un cuarto de incubación, a  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  en un día soleado en condiciones naturales, el manejo adecuado de la intensidad lumínica permitirá a las microplantas aclimatarse a las condiciones del medio ambiente externo más rápidamente (Reyes et al., 1996; Kubota y Rajapakse, 1996). En general se ha observado que las plantas producidas por cultivo de tejidos, una vez transplantadas, muestran un mejor desarrollo y mayores porcentajes de supervivencia si al principio se mantiene la intensidad lumínica baja  $100\text{-}150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  (Granada, 1990; Guerrero, 2000).

Las plantas *in vitro* normalmente no crecen autotróficamente y por eso no requieren alta radiación; sin embargo, a medida que las plantas están sometidas al proceso de aclimatación, requieren altos niveles de luz debido a que estas se ven obligadas a sintetizar sus propios carbohidratos (Seibert y Kadkade, 1982). Como consecuencia, en las hojas de plantas *in vitro* se observan algunas modificaciones anatómicas como que el parénquima en empalizada está poco desarrollado, con cloroplastos grandes y dispersos, esto provoca que se presenten cambios anatómicos, morfológicos y fisiológicos al ser transferidas a otro medio con intensidades de luz mayores, esto se refiere a que los cloroplastos tienden a alargarse, las hojas disminuyan los espacios intercelulares, aumentando la cantidad de estomas por unidad de área e incrementando la cantidad de cera y la complejidad morfológicas de las mismas (Montie, 1981; Darnell y Ferree, 1983; Fabbri et al., 1986).

En trabajos realizados con una intensidad de luz de  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ , se determinó un incremento en la cantidad de clorofila, así como un aumento en tamaño relativo de células del mesófilo y mayor acumulación de materia seca y área total de hoja (Reyes et al. 1996; Kubota y Rajapakse, 1996), en tanto que Maesato et al. (1994), encontraron un aumento de biomasa cuando se modificó la intensidad de luz de  $7.3 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  a  $15.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  un mes después de su transferencia y cuando se mantuvo solamente una de las dos intensidades de luz durante toda la fase de aclimatación, no se presentó ninguna respuesta en plantas de *Lilium japonicum* producidas *in vitro* y Wulster et al. (1997) observó en plantas de *L. longiflorum* alteraciones morfológicas de las hojas a una intensidad de luz de  $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ .

La luz es importante desde la etapa *in vitro*, en *Lilium* se ha encontrado mayor formación de bulbos al someterlos a tratamientos con mayor número de horas luz que en aquellos donde se tuvo mayor número de horas oscuridad (Jeong et al. 1996; Lim et al. 1998) y Capellades et al. (1990), observaron en *Rosa multiflora* que el número de estomas y la longitud de las células epidérmicas de la parte abaxial y adaxial de las hojas fueron mayores cuando se establecieron *in vitro* con una intensidad de luz de  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  y 75% de humedad relativa en comparación con aquellas que se sometieron a una intensidad  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  de luz y 100% humedad relativa.

Laforge et al. (1991) estudiaron la influencia de la luz ( $0, 125$  y  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ ), de densidad de flujo fotónico fotosintético (DFFF) y del  $\text{CO}_2$  ( $330, 1650$  y  $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ ) aplicados en el enraizamiento *ex vitro* de tres especies (fresa, frambuesa y espárragos), en la etapa de aclimatación, determinaron que la mayor concentración de  $\text{CO}_2$  aplicado *in vitro* a brotes incrementaron el peso seco de la planta en un 262 % y redujo en dos semanas el período de aclimatación, observando una interacción lineal y cuadrática para intensidad de luz y concentración de  $\text{CO}_2$  respectivamente, tanto para peso seco de la hoja, como para área foliar y número de hojas y aunque el peso seco acumulado se incrementó significativamente para los niveles mayores de intensidad de luz y  $\text{CO}_2$ , la respuesta se debió al efecto de este último. De la misma

forma, encontraron una tendencia similar para el área foliar y la concentración del  $\text{CO}_2$ , sin embargo, para el primero determinaron que a  $330 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  y  $125 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  de DFFF la respuesta fue óptima, mientras que el número de hojas favoreció a altos niveles de DFFF.

Donnelly et al. (1984) al investigar sobre la capacidad de fijación de  $\text{CO}_2$  en plántulas de frambuesa en un ambiente enriquecido con  $\text{CO}_2$  bajo diferentes intensidades de luz (40, 80 y  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ ) tanto *in vitro* como después del trasplante. Encontraron que la capacidad de asimilación de  $\text{CO}_2$  se incrementó semanalmente, bajo todas las intensidades de luz, pero a  $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  se tuvo la mayor actividad por unidad de área. Después del trasplante las nuevas hojas formadas presentaron mayor capacidad de asimilación de  $\text{CO}_2$  a la mayor intensidad de luz.

Dejardins et al. (1987), estudiaron que el efecto del  $\text{CO}_2$  a (330, 900 y 1500 ppm.) y de la intensidad lumínica (condiciones externas y  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ ), en plántulas de fresa durante la aclimatación, observaron que las mayores concentraciones de  $\text{CO}_2$  favorecieron el peso seco de la raíz y del brote y la intensidad lumínica afectó el peso seco de la hoja y de la raíz desde los 10 primeros días. Estos resultados favorecieron una reducción en 15 días a la etapa de aclimatación, obteniéndose la mejor respuesta con 900 ppm de  $\text{CO}_2$  y  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  de intensidad lumínica.

### 3.3.2. Humedad

La humedad relativa es considerada como el factor que más afecta a la aclimatación de plantas producidas por cultivo de tejidos. Las plantas originadas *in vitro* tienen la cutícula escasamente desarrollada debido a la alta humedad relativa del medio 90-100%, por consiguiente al transferir la planta a *in vivo* se produce una transpiración cuticular extra por la diferencia de humedad, por lo que se requiere un cambio gradual durante la adaptación de las plantas, de lo contrario se marchitan y

eventualmente mueren (Preece y Sutter, 1991; Granada, 1990; Ghashghaie et al., 1992).

La supervivencia y desarrollo de las plantas procedentes del cultivo *in vitro* aún es un problema para algunos cultivos. Las plantas que se transfieren del tubo de cultivo al invernadero o campo, deben someterse a un programa de endurecimiento gradual, con período de disminución de la humedad relativa. A pesar que existen protocolos de aclimatación, en donde se usa nebulización intermitente, frecuentemente ocurren pérdidas significativas, particularmente en especies leñosas de dicotiledóneas (Capellades et al., 1990).

Durante la aclimatación es importante considerar las condiciones ambientales que se encuentran dentro del tubo, ya que se presentan cambios del 40 hasta el 60% de las condiciones *in vitro* a *in vivo* (Read y Fellman, 1985). Con los sistemas de microaspersión, además de mantener una alta humedad relativa, también se incrementa el contenido de humedad del sustrato debiéndose procurar que no sea muy alta, ya que se pueden provocar niveles anormales de  $O_2$  y  $CO_2$ , lo que inhibirá el crecimiento de las plantas en proceso de adaptación. En general, es recomendable que una vez transplantadas, se coloquen en un ambiente cerrado para mantener con mayor eficiencia una alta humedad relativa, sin necesidad de incrementar el contenido de humedad en el sustrato.

La supervivencia de los tejidos cultivados *in vitro* después de sacarse del medio de cultivo, puede depender del balance de los factores que involucran las características de las plantas para el transporte de agua, que están relacionados con el incremento en longitud y el contacto que tienen las raíces con el agua, pudiendo ser importante que la supervivencia dependa de una regulación estomática o cuticular (Shackel et al., 1990). Debergh (1981), indica que la falta de cierre estomático, durante el cultivo de tejidos, es la causa de la deshidratación de las plántulas en la fase de aclimatación, lo cual puede atribuirse al desarrollo anormal de las microfibrillas de las células guarda de las hojas desarrolladas *in vitro*.

Wardle et al (1983) indican que a una humedad relativa del 45 % las plantas de crisantemo *in vitro* tuvieron una alta mortandad (cerca del 70%), debido a un severo retraso en el desarrollo de los estomas, por lo que su diferenciación celular fue menor que aquellas que se desarrollaron en humedades relativas altas (90%). Brainerd y Fuchigami (1981) encontraron que durante la fase de aclimatación de manzano se presenta mayor supervivencia cuando las plantas son sometidas a condiciones de humedad relativa baja (30 a 40 %) en un lapso de 4 a 5 días posteriores a la transferencia, observando mejor respuesta estomática y un mayor desarrollo de las plántulas.

Por su parte, Ritchie et al. (1990) encontraron en crisantemo un crecimiento a 80% de humedad relativa y para Damiano (1980) con *Fragaria x ananassa* recomienda que deba mantenerse una humedad relativa mayor del 90% durante los primeros 15 días postransplante y mayor del 80% durante 14 días para *Saintpaulia inonantha*. Esto indica que debe existir un control específico durante la fase de aclimatación para cada especie y que cada especie tiene un comportamiento diferente a las condiciones de humedad en el ambiente.

Arellano y González (1985) registraron la supervivencia a los 30 y 60 días después del trasplante en ciruelo y fresa, donde a los 30 días para ciruelo se obtuvo 81% y en fresa de 77%, mientras que a los 60 días en fresa fue de 71% y para ciruelo de 69%. En contraste, los resultados de supervivencia obtenidos en fresa por Acosta (1993), fueron casi del 100% en los tratamientos probados, por lo que indica que esta especie no tiene problemas; sin embargo la concentración de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  durante el cultivo *in vitro* repercutió en el desarrollo de las plantas durante su aclimatación.

En conclusión se puede mencionar que el valor de humedad relativa (en promedio 100%) es de suma importancia durante los primeros 30 días de la aclimatación, siendo el factor determinante en la supervivencia de las microplantas. Cabe señalar que en este período es donde se resienten con mayor grado los cambios en los

intervalos de humedad, favoreciendo o no el éxito del experimento. Pasando este período la humedad relativa se considera como un factor complementario, ocupando mayor jerarquía los nutrimentos.

### 3.3.3. Temperatura

La mayoría de los autores han considerado que la temperatura es un factor importante, pero complementario, temperaturas altas o bajas, así como las fluctuaciones muy drásticas pueden dar como resultado un crecimiento muy irregular. El desarrollo de raíces puede acelerarse con el uso de camas calientes especialmente cuando la temperatura del ambiente es baja. Se ha recomendado regular la temperatura del invernadero con el empleo de un termostato cuando se cuenta con instalaciones automatizadas, es decir, invernaderos con muro húmedo, extractores y calefacción (Wardle et al., 1983).

Lilien-Kipnis y Kochba (1987), consideraron que la supervivencia de plántulas de gladiolo después de transferirlas a suelo, dependió de la temperatura, encontrando que a 27°C ninguna plántula enraizó y las raíces formadas *in vitro* murieron. Después de tres semanas, alrededor del 56% de las plantas que sobrevivieron no mostraron crecimiento y el follaje presentó clorosis. A 17°C todas las plantas sobrevivieron, las raíces crecieron y emergieron nuevas hojas. Posteriormente, las plantas se desarrollaron a una temperatura ambiente de 27 a 28°C diurna y 19 a 21°C nocturna presentado del 84 al 92% de arraigo. Resultados similares se han encontrado en lechuga (Koevary, et al. 1978) y frambuesa (Palonen y Buszard, 1998) donde se reportó mayor supervivencia durante la fase de aclimatación, cuando las plantas fueron tratadas inicialmente con temperaturas entre 15 a 18°C, aunque no consideraron que la temperatura fuera el único factor que interviniera en este comportamiento.

En plántulas de calabaza (*Cucumis sativus* L.), Burke y Oliver (1993) observaron que la temperatura óptima de incubación fue entre los 20 y 25°C, ya que con temperaturas inferiores o superiores afectó la actividad enzimática involucrada en

procesos de fijación de carbono; la mayor acumulación de clorofila ocurrió en plántulas bien hidratadas con un potencial hídrico de -0.01 MPa, la cual se redujo notablemente al abatirse el potencial a -0.30 MPa. Lo anterior se atribuyó a la reducción en el contenido de carbohidratos, los cuales podrían estar involucrados en la síntesis de clorofila.

#### 3.3.4. Sustratos

Las mezclas de sustratos a usar en el transplante (musgo, agrolita, vermiculita, arena, tierra de hoja, etc.) influyen en el porcentaje de supervivencia y en el subsecuente desarrollo de las plantas. Las distintas especies pueden desarrollarse bien en diferentes sustratos, sin que exista una norma general para todas las plantas con respecto a que sustrato utilizar; sin embargo, es aconsejable utilizar los sustratos en los cuales las especies normalmente se desarrollan al utilizar los métodos convencionales de propagación vegetativa (Granada, 1990).

En la mayoría de las plantas es importante que el sustrato sea poroso, con buen drenaje, buena aireación y con un pH adecuado. En general el sustrato debe contener al menos 50-60 % de materia orgánica, el pH se debe mantener entre 5.5 y 6.5 (Granada, 1990; Rogers y Tjia, 1990).

Si bien las plantas pueden tener alguna capacidad genética de resistencia a enfermedades, cuando son sacadas de los recipientes de cultivo *in vitro*, son muy susceptibles al ataque de patógenos. Por tanto, la esterilización del sustrato y contenedores, son muy importantes. Con frecuencia se utilizan fungicidas para prevenir el ataque de hongos durante el proceso de adaptación, los cuales se aplican directamente al sustrato o bien a las plantas antes y/o después del transplante (Granada, 1990).

Existen diferentes ingredientes que pueden ser combinados para lograr un sustrato apropiado para las plántulas, tomando en cuenta que estas presentan raíces pequeñas y delicadas y requieren sustratos de textura fina. Las mezclas empleadas más comúnmente contienen aproximadamente 50 % de turba más perlita, vermiculita o agrolita, con tierra de hoja previamente esterilizada. Después del establecimiento en la cámara, las plantas están listas para el transplante en macetas más grandes (Wardle et al., 1983).

En zarzadoras se obtuvo el 4.3 % de supervivencia de plantas enraizadas *in vitro* y después de transplantadas en turba, mientras que los brotes sin raíz transplantados y enraizados directamente en turba, sobrevivieron el 71% (Skirvin y Chua 1981). Por otro lado, Rugini y Fontazza (1981) reportan que la transferencia a suelo de plantas enraizadas *in vitro* y colocadas en bloques de turba de 11 X 46 mm obtuvieron el 100% de supervivencia.

Damiano (1980) mencionó que los mejores resultados los obtuvo con turba con un pH de 5.5 a 7. Así mismo, Linenberger (1983) señaló que después de 21 días microestacas de cerezo cv Hally Jolivette enraizaron *in vitro* el 78 % y su supervivencia en suelo en una mezcla sin esterilizar de turba y perlita 1:1 (v/v) fue mayor, sin embargo, en aquellas plantas que enraizaron *in vitro* presentaron el 80% de supervivencia

A continuación se describen algunas características generales de los materiales más comunes utilizados como sustrato en la fase de aclimatación de plantas obtenidas *in vitro*.

#### **a) Agrolita.**

Es un mineral de origen volcánico que es calentado a 982.2°C para expandir la partícula, debe ser cribado para eliminar el polvo. Las propiedades de la agrolita son:

- Partículas grandes.
- Buena aireación. Incremento en el espacio poroso, lo cual mejora el drenaje.

- Baja retención de humedad.
  - Espacio poroso total. EPT o Pt = 95.47%
  - Volumen de aire. CA. =74.40%
  - Agua fácilmente disponible AFD = 5.13%
  - Agua de reserva AR = 1.39%
  - Agua difícilmente disponible ADD = 14.55%
- Muy baja densidad. Ingrediente que aligera mucho la mezcla.
  - $D_a = 0.12\text{g}\cdot\text{cm}^3$ .
  - $D_r = 2.65\text{g}\cdot\text{cm}^3$ .
- Baja CIC.
  - Conductividad eléctrica CE =  $0.01\text{dS}\cdot\text{m}^{-1}$ .
- PSB intermedio, pH cercano al neutro.
- No tiene capacidad amortiguadora.
- Baja en sales solubles.
  - $N = 2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .
  - $P = 3\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .
  - $K = 4\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .
  - $Ca = 190\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .
  - $Mg = 7\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .
- Libre de plagas y/o enfermedades.
- Libre de sustancias tóxicas.
- Fácil de mezclar. Puede incorporarse hasta un 80% de la mezcla.
- Uniformidad de lotes.
- Fácil disponibilidad.
- Precio intermedio.

#### **b) Turba.**

- 95% orgánico
- pH 3,4 a 4,4
- pH después de la incubación : 5,5 – 6,0

- Conductividad eléctrica : 0,8 – 1,2 mmhos/cm
- Ácido Humico( % ) 3.5 - 4.0
- Contenido de ceniza 5 %
- Densidad aparente :70 - 80 g/l
- % en humedad : 35 % à 45 %
- Absorción: 12 veces su peso seco
- Exenta de insectos y sin olores desagradables
- Enriquece todo tipo de suelos
- De utilización agradable
- Permite reducir la frecuencia de los riegos
- Asegura a las plantas un crecimiento óptimo
- Desarrolla al máximo el sistema radicular
- % del contenido de agua 35 a 55
- Gran capacidad de retención de agua.

### 3.3.5. Nutrición.

En general, los trabajos que se han efectuado para la fase de aclimatación están dirigidos en la variación de condiciones ambientales, principalmente: luz, temperatura y humedad; pero poco se ha considerado que la planta proveniente del cultivo *in vitro*, se encuentra en condiciones idóneas de nutrición y al ser transferidas a un medio en el cual el vegetal deberá absorber sus nutrimentos en forma activa, la planta no cuenta con condiciones favorables para tal fin, por lo tanto puede disminuir la posibilidad de adaptarse a condiciones naturales (Guerrero, 2000). Siendo una posible razón por las cuales se tiene una baja sobrevivencia durante esta etapa, la cual solo llega a alcanzar el 45% en algunas especies (Ghashghaie et al. 1992, Granada, 1990; Marino, 1983).

Con relación a la nutrición suplementada en fase de aclimatación en *Agavaceae*, no existe nada reportado al respecto, sin embargo, Velásquez-Mendoza y Fucikovsky (2003) encontraron que las plantas de *Agave tequilana*, de un año de establecidas,

requieren de una relación N-P-K de 5:1:3, obteniendo un mayor número de hojas, y mayor longitud del cogollo. Además encontraron que el *A. tequilana*, responde mejor a bajas concentraciones de nitrógeno, fósforo y potasio y que el amonio tuvo una estrecha relación con los niveles de deficiencia oculta, óptima y consumo de la curva de abastecimiento nutrimental.

#### **3.4. Características de las plantas propagadas *in vitro*.**

La anatomía y fisiología de las plantas propagadas *in vitro* presentan alteraciones en sus características y procesos, con relación a las plantas que crecen en ambientes naturales, por lo que se hace necesaria una gradual adaptación o aclimatación a las condiciones medioambientales que favorezcan un crecimiento normal de las plantas (Read y Fellman. 1985; Debergh, 1991).

Durante el cultivo de tejidos, los explantes son confinados a un ambiente casi o totalmente hermético y controlado, lo que puede ocasionar modificaciones tanto en la composición de los gases de la atmósfera del frasco de cultivo, como en la morfología, anatomía y fisiología de las plantas (Cournac et al., 1991; Dube y Vidaver, 1992; Yue et al, 1992).

En general, las plantas no presentan cambios morfológicos observables a simple vista, sin embargo, se han encontrado que las vitroplantas no llegan a presentar algunas características como pubescencia en la lámina foliar y su tamaño y grosor es comparablemente menor al de plantas formadas en condiciones naturales (Guerrero, 2000). Pero al observar la anatomía de las plantas, se encuentran grandes diferencias como el grosor de cutícula, menor número de vasos del sistema de conducción, células menos isodiamétricas, entre otras características.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Ubicación

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y en el área de invernaderos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicada en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.

### 4.2. Material vegetativo.

Se utilizaron vitroplantas de *Agave tequilana* Weber var. Azul obtenidas previamente *in vitro*, a partir de brotes de hijuelos de rizoma, en el medio de cultivo Cruz-Pizarro (2000), (anexo 2) de 6 semanas en tubo, las cuales fueron transferidas a macetas de plástico de 4 pulgadas de diámetro.

### 4.3. Características del área de investigación

Se utilizó un invernadero tipo dos aguas, con cubierta de cristal, utilizando en su interior malla sombra de 35 % de reflexión de luz, nebulizadores y humidificador, el piso se acondicionó con una capa de tezontle.

Para mantener condiciones asépticas del cuarto de aclimatación, se realizó aspersiones de Captan ( $3.0 \text{ g L}^{-1}$ ) cada siete días, durante todo el experimento.

### 4.3.1. Sustratos

De acuerdo a las características físico-químicas que presentan los sustratos y a trabajos similares realizados sobre aclimatación, se decidió utilizar una mezcla de turba (Peat moss) y agrolita en una proporción 3:1 v/v, con la finalidad de mantener suficiente humedad en el medio de anclaje y proporcionar cierta cantidad de nutrimentos derivados del sustrato orgánico (turba)

### 4.3.2. Luz

Durante los primeros 15 días se mantuvo una intensidad lumínica de  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ , valor al cual las plantas empiezan normalmente su actividad fotosintética; aumentando posteriormente a  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$  durante un periodo de 30 días, para terminar con  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ , hasta finalizar el experimento (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Manejo de la Intensidad lumínica durante la fase de aclimatación de *A. tequilana* Weber cv azul obtenido *in vitro* con diferente proporción N-P-K.

PERIODO	PROTECTOR	INTENSIDAD LUMÍNICA ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{seg}^{-1}$ )	DIAS DESPUES DE TRANSFERENCIA
1	Encalado + malla + sombra	130	0
2	Encalado y malla sombra	500	16
3	Encalado	1000	31 a 84

### 4.3.3. Humedad Relativa

Se mantuvo una Humedad Relativa (HR) alta (90%) con la utilización de la bolsa de plástico durante los primeros siete días, posteriormente se emplearon nebulizadores y humidificador ultrasónico, que permitió durante los siguientes 15 días mantener una HR promedio de 80%, disminuyendo progresivamente 20% de HR cada 15 días, hasta terminar con la HR entre 40 y 60% (Cuadro3).

**Cuadro 3.** Manejo de Humedad relativa y temperatura durante la fase de aclimatación de *A. tequilana* Weber cv azul obtenido *in vitro* con diferente proporción N-P-K.

Etapas	Aspersión	Días después de transferencia	Humedad %	Temperatura °C	
				D	N
1	Ninguno (Bolsa de polietileno)	0	95	26	24
2	4 riegos por día y humidificador	16	80	25	24
3	3 riegos por día	31	60	25	18
4	2 riegos por día	46	50	21	12
5	1 riegos por día	61	40-60	21	12

D = Temperatura Diurna; N = Temperatura Nocturna

#### **4.4. Manejo agronómico**

##### **4.4.1. Transplante**

Se extrajeron las plantas del medio de cultivo, lavando las raíces, para eliminar los residuos del medio de cultivo, posteriormente, se sumergieron en una solución fungicida (Captan a razón de  $3.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) durante 10 segundos, finalmente se eliminaron las raíces y se aplicaron auxinas a 5000 ppm (Radix) con la finalidad de promover el desarrollo de nuevo sistema radical y así asegurar un mayor porcentaje de arraigo.

Posteriormente se transplantaron en macetas de 4", cubriéndolas con bolsas de plástico transparente durante los primeros 7 días para mantener una humedad relativa alta y evitar la deshidratación y muerte de las mismas; por último se colocaron espacialmente de acuerdo al arreglo experimental.

##### **4.4.2. Riegos**

Se aplicó un riego ligero diariamente y fertirrigación en dos oportunidades semanales, con un gasto de  $40 \text{ ml}\cdot\text{planta}^{-1}$ , desde el inicio hasta el final de la investigación.

##### **4.4.3. Control fitosanitario**

Las condiciones ambientales de elevada HR y temperatura, son idóneas para el desarrollo de enfermedades fungosas, por lo que se realizó en forma preventiva, la aplicación de fungicida cada siete días, (Captan a razón de  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).



#### **4.5.2. Variables de estudio**

Se consideraron como índices de aclimatación la formación y crecimiento de nuevos tejidos de hoja y tallo, por tanto, se realizaron doce evaluaciones con intervalos de siete días durante la fase de aclimatación considerando número y longitud de hoja; longitud de raíz y volumen de planta considerando el diferencial entre inicial y final.

##### **Número de hojas**

El registro inicial de datos para este parámetro se realizó antes de efectuar el transplante, posteriormente se tomaron datos cada siete días, se contabilizaron únicamente las hojas que estuvieron totalmente separadas del cogollo. Todos los datos fueron considerados para ser graficados, pero únicamente la diferencia entre la medición inicial y final se analizó estadísticamente.

##### **Longitud de planta**

La primera medición fue antes del transplante, después se continuó a la tercera semana del transplante y posteriormente se llevaron a cabo cada siete días, para lo cual se utilizó una vernier, la altura se tomó a partir de la base hasta el ápice de las hojas (Espiga apical). Similar al número de hojas, los resultados de cada muestreo fueron considerados para determinar el crecimiento relativo y la velocidad de crecimiento, mientras que la diferencia entre el tamaño inicial y final, se consideró para su análisis estadístico.

##### **Longitud de raíz**

La longitud de raíz se determinó por el método de Bohn (1979), el cual refiere que las raíces deben ser colocadas en una charola de cristal con papel milimétrico en el

fondo, con el cual se contabiliza las intersecciones de las raíces con la cuadrícula, para aplicar la fórmula siguiente:

$$R = N \times UC \times 0.7857$$

Donde: R = Longitud de raíz en cm  
N = Número de intersecciones  
UC = Unidad de la cuadrícula (0.5 cm)

El dato que se consideró fue solo el del final del experimento, en virtud que fueron eliminadas las raíces al momento de la transferencia a suelo, por lo tanto, todas las plantas tuvieron la misma oportunidad de crecimiento, sin importar el tratamiento al que fueron sometidas.

### **Volumen de planta**

Se estableció el crecimiento de la planta a través del espacio que ocupaba en el espacio a través de su volumen, el cual se valoró por medio de un volumen conocido en una probeta graduada, que al colocar el material vegetativo se contabilizó el incremento que presentó. Las mediciones se hicieron previo a la transferencia a suelo, como al final del experimento, 12 semanas posteriores al transplante. La diferencia entre estos dos resultados fue la que se consideró para los análisis respectivos.

### **Análisis estadístico**

A todas las variables se les realizó análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de diferencia mínima significativa de Tukey ( $P \alpha 0.05$ ).

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En general, se encontró que las plantas que fueron tratadas con suplementación nutritiva durante la fase de aclimatación, tuvieron un mejor crecimiento que las plantas a las que no se les adicionó ninguna fertilización; solamente en la variable longitud de raíz se tuvo un mayor crecimiento en las testigos a comparación de la mayoría de los tratamientos.

Los análisis de varianza aplicados a las diferentes variables de estudio, no mostraron diferencias estadística significativas con respecto a número de hojas y longitud de planta; pero se encontraron diferencias altamente significativas en volumen de planta y longitud de raíz (Cuadro 5). Sin embargo, a pesar de no tener similitudes en los tratamientos de las dos primeras variables, se encontraron diferencias que son importantes de ser analizadas en relación con los tratamientos a las que fueron sometidas.

### 5.1. Número de hojas

La mayoría de las plantas tuvieron un promedio de incremento en el número de hojas de 1 a 2 (Grafica 1), a partir de las formadas *in vitro*, las cuales en forma general se fueron perdiendo a través del tiempo de aclimatación, como lo reportó Fabbri et al. (1986) en plantas de fresa y Guerrero (2000) en plantas de lilis, las hojas formadas *in vitro* sirven para la formación de nuevos órganos, hojas y raíces, durante la fase de aclimatación, debido a que son la primera fuente de carbohidratos bajo condiciones externas, cuando la planta pasa a ser un organismo totalmente autótrofo. Observamos que, el *Agave tequilana* no está exento de este mecanismo de adaptación, presentándose dos hojas al salir de tubo, las cuales pierde gradualmente en un lapso de tiempo de 7 a 10 días, pero generan la formación de nuevas hojas

que por lo menos morfológicamente, cuentan con todas las características para crecer en forma normal en condiciones naturales.

**Cuadro 5.** Diferencias de las variables número de hojas, longitud de planta, volumen de planta y longitud de raíz, en plantas con diferente dosis de N-P-K durante la aclimatación de *Agave tequilana* obtenidas *in vitro* a las 12 semanas después del transplante.

Trat	Dosis N-P-K en mEq·L <sup>-1</sup>	Número de hojas	Longitud de planta	Volumen de planta	Longitud de raíz
1	1-0.15-0.66	1.5	a 2.0243	a 2.6437	a b 5.7375
2	3-0.15-0.66	2.1875	a 1.3937	a 2.6437	a b 5.5187
3	1-0.45-0.66	1.4375	a 1.6125	a 1.5725	d 5.675
4	3-0.45-0.66	1.625	a 1.9375	a 2.125	c 7.175
5	1-0.15-1.98	2.25	a 2.2812	a 2.9687	a 6.8312
6	3-0.15-1.98	1.9375	a 1.9687	a 2.7812	a 6.4062
7	1-0.45-1.98	1.75	a 1.2625	a 2.3593	b c 5.2625
8	3-0.45-1.98	2.0625	a 1.45	a 2.4875	b 6.375
9	4-0.30-1.32	1.75	a 1.8062	a 2.4375	b c 6.0062
10	2-0.60-1.32	2.0625	a 1.5687	a 2.3343	b c 6.7562
11	2-0.30-1.32	2.3125	a 1.3937	a 2.4062	b c 5.4312
12	2-0.30-2.64	2.625	a 1.3187	a 1.9968	c d 6.2937
13	0-0-0	1.6875	a 1.0437	a 2.2625	b c 6.5687

Tratamiento con la misma letra son estadísticamente iguales según Tukey ( $p \geq 0.05$ )

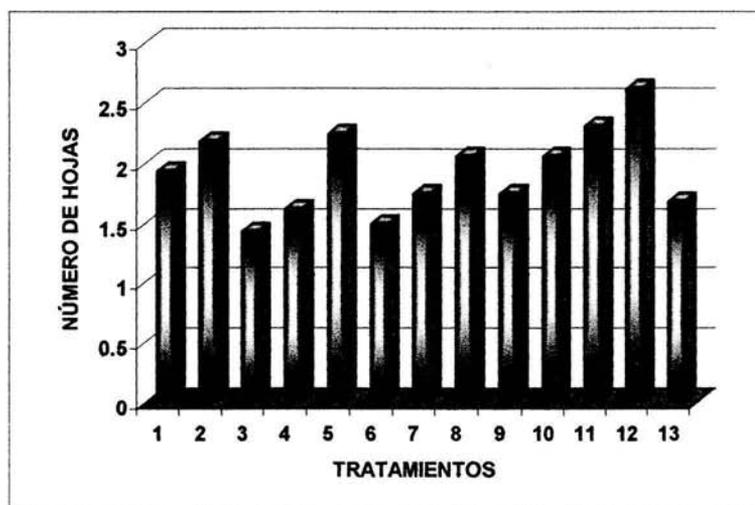
Sin embargo, en este proceso de formación de nuevas hojas, no se puede considerar que sea necesario la aplicación de solución nutritiva, por lo menos en los primeros días después de su transferencia, pues las plantas del testigo (tratamiento 13) presentaron un comportamiento similar a las de algunas suplementadas nutrimentalmente, como las de los tratamientos 3 y 6 (gráfica 2), pero tampoco puede considerarse que no se tenga un efecto positivo en la suplementación nutrimental, pues en la mayoría de los tratamientos encontramos mayor formación de nuevas hojas, siendo el mejor tratamiento el de concentración N - P- K de 2 - 0.30 - 2.64 mEq·L<sup>-1</sup> (tratamiento 12). Este resultado puede deberse al efecto de la relación e interacción entre los tres macronutrientes, lo cual puede estar involucrado más directamente entre la relación N : P, la cual es 6.66 : 1, lo cual es similar a lo propuesto por Velásquez-Mendoza y Fucikovsky (2003) en el abastecimiento nutrimental de plantas de *Agave tequilana* con un año de crecimiento y bajo condiciones naturales, donde determinaron que la relación N : P es de 5 : 1 y se refuerza por la expresión de las plantas de los tratamientos 11 y 5, donde, a pesar de ser diferentes en la concentración de N y P, la relación se mantiene igual, teniendo el mayor número de nuevas hojas formadas en el período de aclimatación. Pero es importante considerar que una alta concentración de fósforo fue contraproducente para el desarrollo de nuevas hojas, pues las plantas donde se aplicaron 0.45 mEq·L<sup>-1</sup> de este elemento tuvieron menor cantidad de hojas, más aún si la concentración de N y/o P fue mínima, como lo muestran las plantas de los tratamientos 3 y 7.

Al ver el comportamiento a través del tiempo (gráfica 1) se muestra que todas las plantas, independientemente del tratamiento, presentaron una disminución en el número de hojas durante la primera semana, lo cual puede considerarse normal por el efecto de estrés que presentan las plantas al ser transferidas del tubo a condiciones naturales.



Con respecto al comportamiento, la gráfica 1 muestra que la formación de nuevas hojas es constante y con tendencia a incrementarse conforme el tiempo transcurre, sin presentarse, en ninguno de los tratamientos, plantas con nuevas hojas, manteniendo hasta el último muestreo, un número entre 5 y 6 hojas. Sin embargo, las plantas del tratamiento 12, aunque no fueron las que tuvieron más láminas foliares al final de la investigación, si tuvieron un mayor número de hojas nuevas con respecto a las que presentaron al inicio de la investigación. Mientras que las del tratamiento 4 fueron las que mayor número tuvieron al final de la investigación, pero siendo 39% menos eficiente en la formación de hojas, con respecto a las del tratamiento 12.

**Gráfica 2.** Número de hojas neoformadas en las plantas de *Agave tequilana* Weber cv azul, obtenidas *in vitro*, sometida a diferentes niveles de N-P-K durante la fase de aclimatación a las 12 semanas después del transplante.



## 5.2. Longitud de planta

Con respecto a esta variable, no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 5), sin embargo, se pudo observar, en la mayoría de los tratamientos, un comportamiento contrario al del número de hojas, siendo las plantas del tratamiento 12 las que menor longitud alcanzaron, mientras que las del tratamiento 1 fueron de las que mayor incremento tuvieron (gráfica 3), esto pudo deberse al establecimiento de un equilibrio entre formar nuevas láminas foliares con el crecimiento de las mismas, lo cual genera una correlación negativa, aunque no significativa estadísticamente (Cuadro 6).

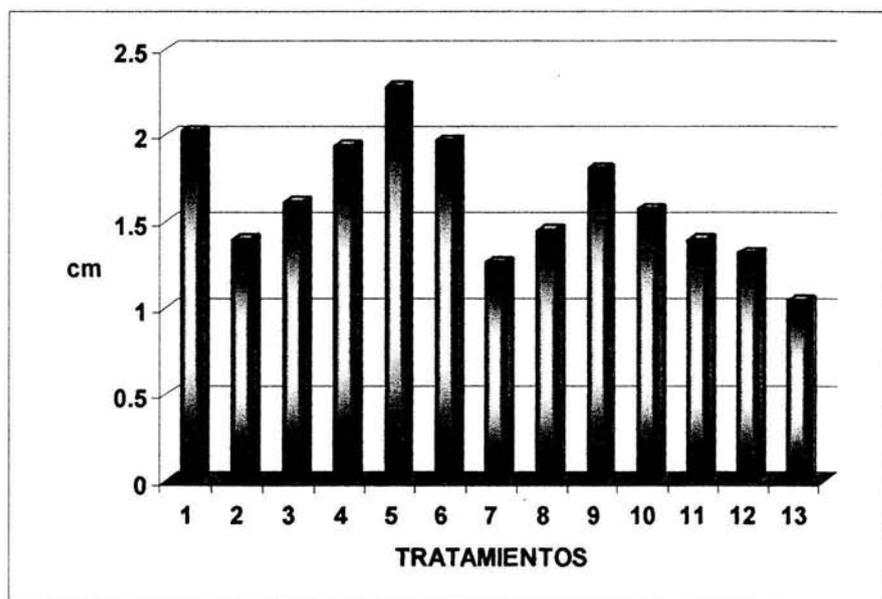
En este parámetro, se pudo observar que las plantas testigo (tratamiento 13), fueron las que menor incremento de tamaño tuvieron lo cual indica que para el crecimiento si fue positiva la aplicación de solución nutritiva, lo cual indica que la planta si tiene un aprovechamiento de los nutrimentos y existe un comportamiento similar al de la fase *in vitro*, en la que se encuentra en solución los elementos que requiere para su crecimiento y son tomados en forma pasiva al ser introducidos al sistema de la planta junto con el agua, situación similar ocurre al aplicar fertirrigación en un sistema hidropónico.

Sin embargo, se observó que las plantas del tratamiento 5 (gráfica 4), tuvieron el mejor comportamiento en cuanto a longitud de planta se refiere, donde nuevamente se puede considerar la importancia de la relación N : P : K, pues si bien se podría mencionar que la mayor concentración de potasio, con respecto al nitrógeno, pudo haber sido un factor que favoreció el crecimiento, como lo muestra la respuesta del tratamiento 6, donde las plantas tuvieron también un excelente comportamiento, sin embargo, bajo la misma relación N : K, las plantas del tratamiento 7, fueron 45% menores que las del mejor tratamiento, lo cual indica la concentración con el fósforo, donde, en este último tratamiento, se tuvo la mayor cantidad del elemento.

Al observar el crecimiento de las plantas a través del tiempo, se encontró el mismo comportamiento que la formación de nuevas hojas (gráfica 4), en todos los tratamientos las plantas tuvieron una disminución de la velocidad de crecimiento, lo cual pudo deberse al cambio de ambientes entre la fase *in vitro* y la de aclimatación, solo las plantas del tratamiento 9 tuvieron un comportamiento diferente, pues en ellas se observó un comportamiento constante en forma alternada hasta la octava semana (gráfica 4), en la cual tuvo un despegue que le permitió tener un mejor crecimiento en comparación con la mayoría de las otras relaciones N - P - K, a excepción de los tratamientos 1, 4, 5 y 6. Esta respuesta pudo ser resultado de la alta concentración de nitrógeno que se aplicó en la solución nutritiva, sin embargo, en general, se encontró que las de menor cantidad del elemento ( $1 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ ) tuvieron la mejor respuesta (tratamientos 5 y 1). Esto sin demeritar la actuación de los otros elementos adicionales que acorde a una relación N-P-K generan resultados antagónicos a las respuestas esperadas, aunque vuelve a apoyarse el hecho de que a mayor concentración de nitrógeno no se tiene la mejor respuesta, por lo menos en *Agave tequilana*, como lo establecen Velásquez-Mendoza y Fucikovsky (2003).

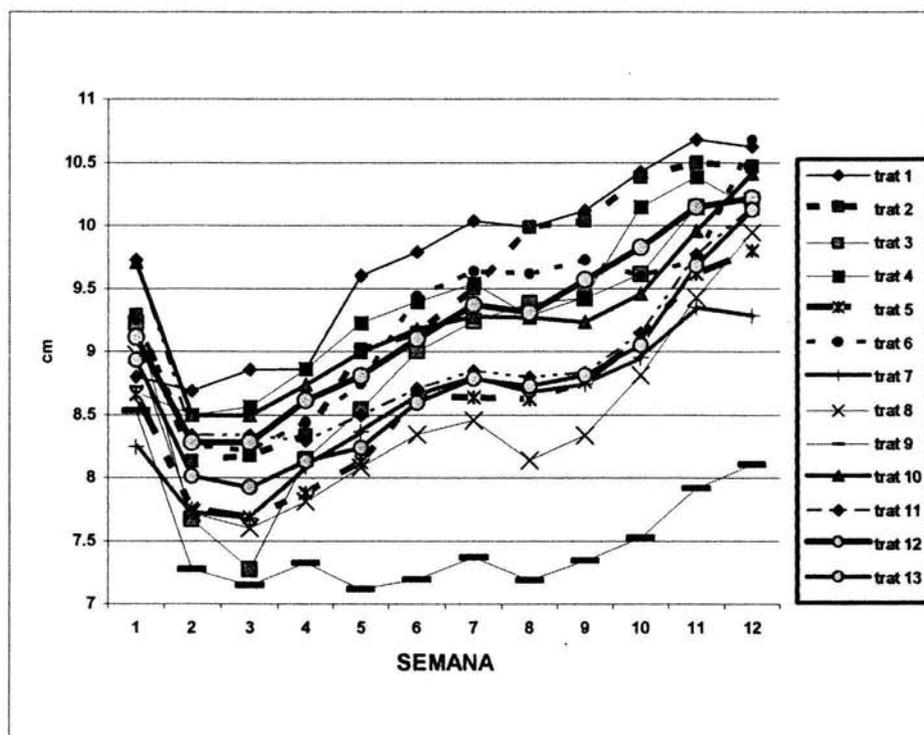
Pero en general, todos los tratamientos incrementaron la velocidad de crecimiento a partir de la novena semana, que se mantiene hasta el final de la investigación y se infiere que continuará este mismo comportamiento, lo cual debe llegar a estabilizarse en terreno definitivo, cuando la planta alcanza su completa madurez siendo de siete años como lo establece ASERCA (2000).

**Gráfica 3.** Incremento final para la variable longitud de las plantas de *Agave tequilana* Weber cv azul, obtenidas *in vitro*, durante la fase de aclimatación a las 12 semanas después del transplante.



Es importante mencionar que si bien las plantas del tratamiento 1 fueron las que aparentemente mantuvieron una curva ascendente en lo que a velocidad de crecimiento se refiere, a partir de la 4<sup>ta</sup> semana de evaluación, no fue la que mejor resultado tuvo aunque comparativamente resulta insignificante, siendo menor del 1% la diferencia contra las plantas del mejor tratamiento (tratamiento 5), teniendo este último una menor longitud al terminar los muestreos pero una mayor ganancia con relación al tamaño que presentó al momento de la transferencia y que tuvo un comportamiento de incremento constante en la velocidad de crecimiento a partir de la 3<sup>era</sup> semana, posteriormente una constante desde la 6<sup>o</sup> al 9<sup>o</sup> muestreo para volver a presentar un aumento constante hasta el final de la fase de aclimatación.

**Gráfica 4.** Crecimiento Relativo de longitud de hoja en plantas de *Agave tequilana* Weber cv azul, durante la fase de aclimatación a las 12 semanas después del transplante.



### 5.3. Volumen de planta.

En cuanto a la variable volumen de planta se encontraron diferencias altamente significativas (cuadro 5), a este respecto se puede observar (gráfica 5) que el comportamiento de las plantas del tratamiento 5 obtuvieron el incremento mas alto de todos con un aporte bajo del elemento fósforo ( $0.15 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ ), a diferencia del tratamiento 3 que observó una respuesta menor cuando el aporte del elemento fósforo fue mayor ( $0.45 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ ) manifestando una disminución importante en cuanto a la variable en cuestión.

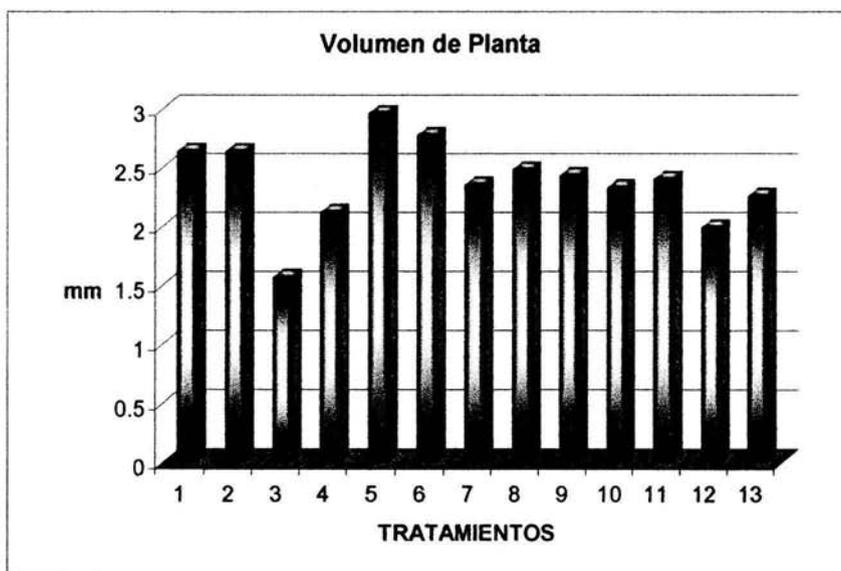
El tratamiento número 5 está relacionado estrechamente con la variable longitud de planta que también en su comportamiento del tratamiento 5 fue el mejor, esto puede deberse a que las plantas tuvieron un mayor crecimiento y por ende mayor volumen, pudiendo deberse a que se tenga mayor número de células, o éstas tengan mayor turgencia resultado del efecto simple de la presencia de potasio en la solución nutritiva sobre el volumen final de las plantas.

La tendencia del efecto de las concentraciones sobre el volumen de las plantas está dirigida hacia el incremento, indicando que no se ha cubierto la demanda nutricional de las plantas y asumiendo con ello que la demanda de potasio en las plántulas del agave es alta, por lo que se sugiere emplear altas concentraciones ( $1.98 \text{ mEq L}^{-1}$ ) de este elemento.

Es importante la relación P:K en la ganancia de volumen ya que en el tratamiento número 5, que mostró el mejor comportamiento, tuvo una concentración P : K de  $0.15 : 1.98 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ , que es la menor para fósforo y la mayor para potasio; en cuanto al tratamiento número 3, que manifestó una menor ganancia de volumen incluso menor que el testigo en 35%, con una relación P:K con fósforo ( $0.45 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y potasio de ( $0.66 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ ) fue inverso a la relación que se presentó en el tratamiento 5.

En general, se tuvo un incremento de volumen de planta entre el inicial y final superior al 100%, pero fue el tratamiento 5 el que presentó un aumento del orden de 264%, mientras que el tratamiento 3, mostró el menor incremento, con un diferencial de 186%, teniendo una diferencia entre ellos de 78%

**Gráfica 5.** Incremento de volumen en las plantas de *Agave tequilana* Weber cv azul, obtenidas *in vitro* durante la fase de aclimatación a las 12 semanas después del trasplante.



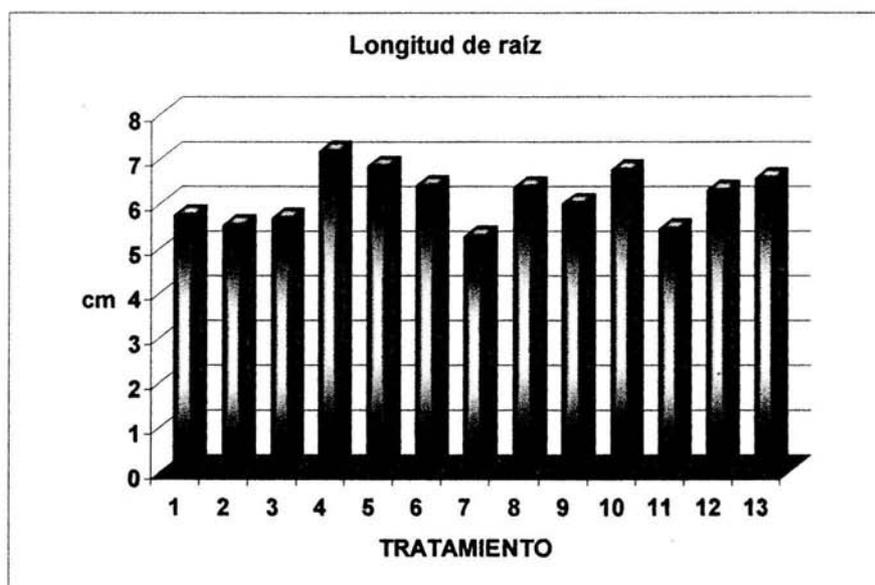
#### 5.4. Longitud de raíz

Es importante proporcionar condiciones adecuadas al sistema radical en los primeros días de la aclimatación para que este órgano comience a funcionar y generar nuevas raíces que puedan absorber agua y nutrientes para evitar que las plantas mueran.

Respecto a la variable longitud de raíz se encontraron diferencias significativas (Cuadro 5), a este respecto las plántulas en general tuvieron un incremento radical entre 5 y 7cm promedio al término de los muestreos (gráfica 6), sin embargo el comportamiento del tratamiento 4 fue el que obtuvo mayor ganancia en la estructura radical con 7.18cm, en contra parte el tratamiento 7 fue el que menor respuesta

mostró al aporte nutrimental, en consecuencia a esto el desarrollo del sistema radical fue de menor longitud que los tratamientos restantes en esta variable.

**Gráfica 6.** Crecimiento de longitud de raíz en plantas de *Agave tequilana* Weber cv azul, obtenidas *in vitro*, durante la fase de aclimatación a las 12 semanas después del transplante.



En cuanto a esta variable se puede considerar que el crecimiento que tuvo la raíz dependió totalmente de la formación y crecimiento de los órganos aéreos, en virtud que inicialmente fueron podadas las raíces provenientes de la fase *in vitro*.

Encontrando una alta diferencia significativa al realizar los análisis de varianza correspondientes, por lo que se realizó la comparación de medias por el método de Tukey, estableciéndose el análisis siguiente:

Las plantas del tratamiento 5 siguen presentando un mejor comportamiento presentándose solo una diferencia de 5 % con respecto al mejor tratamiento, lo cual implica que estas plantas mantuvieron un equilibrio en la formación y crecimiento de sus diferentes órganos (hojas y raíces) y corresponde a una relación N : P : K de (1-0.15 - 1.98) en donde se demuestra que las bajas concentraciones de nitrógeno son favorables para el desarrollo del *Agave tequilana*; sin embargo, no representó el mejor tratamiento, lo cual no puede ser imputable a ninguno de los elementos nutrimentales, pues si bien las plantas del tratamiento 4 que fueron las que mayor longitud de raíz alcanzaron y que pudiera considerarse que el efecto de la mayor concentración de fósforo ( $0.45 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ ) pudo inducir a un incremento del sistema radical, no puede establecerse como un efecto directo en virtud que tratamientos con una concentración igual no tuvieron un crecimiento similar al del mejor y si bien pudiese existir una relación entre el fósforo y el potasio, en el estimativo de una mayor concentración de K con respecto a P para producir un mejor resultado que se pudiese establecer conforme lo muestran las plantas del tratamiento 10, se denega dicha condición pues resultó con mejores características la del tratamiento 5 las cuales tuvieron una concentración P : K de 1:20.

Ante lo expuesto, se puede inferir que existe una relación entre el número de hojas y la longitud de raíz, lo cual se comprueba al realizar la correlación entre variables que si bien no resulta significativa, se puede observar que a mayor número de nuevas hojas formadas durante la fase de aclimatación tiene una tendencia a menor longitud de raíz (Cuadro 6) .

**Cuadro 6.** Correlación de las variables número de hojas, longitud de planta, volumen de planta y longitud de raíz de plantas de *Agave tequilana* Weber cv. azul, obtenidas *in vitro* a las 12 semanas después del transplante.

	Número de hojas	Longitud de hojas	Volumen de planta	Longitud de raíz
Número de hojas	1	-0.159961	0.22165	-0.04674587
Longitud de hojas	-0.159961	1	0.441334	0.36600282
Volumen de planta	0.2216495	0.441334	1	0.09061582
Longitud de raíz	-0.046746	0.3660028	0.090616	1

## VI. CONCLUSIONES

1. En general, las plantas que se les aplicó fertilización durante la fase de aclimatación, superaron el crecimiento de las plantas testigo, con excepción para la variable longitud de raíz.
2. En los primeros días de la fase de aclimatación, las plantas presentan pérdida de algunas de las hojas formadas *in vitro*, las persistentes continúan teniendo un patrón de crecimiento aparentemente normal.
3. La aplicación de solución nutritiva tuvo un efecto positivo en el número de hojas durante la fase de aclimatación, siendo importante la relación N : P, de 6 : 1 fue la que mejor resultado expreso, mientras que una relación 2 : 1 disminuyó el tamaño de las hojas.
4. El crecimiento relativo de número de hojas fue similar en todos los tratamientos, mientras que en la longitud de planta se tuvo un comportamiento en forma sigmoide y solo las plantas del tratamiento 9 presentaron un comportamiento constante en forma alternada.
5. La mayor concentración de potasio con respecto a fósforo, generó mayor volumen de planta, siendo la mejor relación 13 : 1.
6. La respuesta del crecimiento de raíz en todos los tratamientos, está en relación directa con el número de hojas, donde se presentó una correlación negativa entre esta variable y la longitud tanto de raíz como de planta.
7. El tratamiento 5 con una concentración N : P : K en  $\text{mEq}\cdot\text{L}^{-1}$  de 1- 0.15- 1.98 respectivamente, tuvo la mejor respuesta en longitud de hoja y volumen de la planta y fue estadísticamente igual, en las variables número de hojas y longitud de raíz, al del mejor tratamiento.

## LITERATURA CITADA

- Acosta, M. C. 1993. Efecto del  $\text{NH}_4^+$ :  $\text{NO}_3^-$  en la micropropagación de fresa y su relación en la aclimatación, con base en su capacidad fotosintética. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México 107 p.
- Adrijany, V.S., G. Indrayanto and L.A.I Soehono. 1999. Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt, ions on sapogenin steroids content in callus of *Agave amaniensis*. *Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture* 55:103-108.
- Arellano, O. G. y S. B. González. 1985. Efecto del recipiente, intensidad de luz y microambiente en el establecimiento a suelo de *fragaria x ananassa* Duh. y *Prunus cerisifera* obtenidas *in vitro*. Tesis de Licenciatura. UNAM. F.E.S. – Cuautitlan México. 122 p
- ASERCA. 2000. Claridades Agropecuarias. El Agave tequilero; pencas que abrazan al mundo. Núm. 87. ASERCA.SAGAR. México. 7 p.
- Atta-Allay Van, 1997. Micropropagation and establishment de of *Yucca aloifolia*. *Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture* 48:209-212.
- Binh, L.T., L.T Mui, T.D.Tang and T.D. Pong, 1990. Rapid propagation of *Agave cantala*, *A. fourcroydes* y *A. sisalana* by tissue cultura. *Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture* 23:67-70.
- Blazich F.A; and R.T. Novitzky. 1984 *In vitro* propagation of *Sansevieria trifasciata*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 19:1, 122-123
- Brainerd K. E. and L. H. Fuchigami. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106:515-518.

- Burke J. J. and M. J. Oliver. 1993. Optimal thermal environments for plant metabolic processes (*Cucumis sativus* L.) light-harvesting chlorophyll a/b pigment-protein complex of photosystem II and seedling establishment in cucumber. *Plant Physiol.* 102:295-302.
- Castro-Concha, L., M.V.Loyola-Vargas, J.L. Chan and Robert M.L., 1990. Glutamate dehydrogenase activity in normal and vitrified plant of *Agave tequilana* Weber propagated *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 22:147-151.
- Capellades M., R Fontarnau., C. Carulla. and P. Debergh. 1990. Environment influences in anatomy of stomata and epidermal cells in tissue culture of *Rosa multiflora*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115:141-145.
- Chua, B.U., J.T. Kunisaki, and Y. Sagawa. 1981 *In vitro* propagation of *Dracaena manginata* var. tricolor *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 16:494.
- Consejo Regulador del Tequila. 2000. Avances en la investigación científica del *Agave tequilana* Weber Azul. Comité Técnico Agrícola. Boletín Técnico No.1 Junio de 2000. México. 14p.
- Cournac L., B. Dimon, C. Patrick, A. Lohou and P. Chaguardieff. 1991. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply and CO<sub>2</sub> enrichment. *Plant Physiol.* 97:112-117.
- Cruz-Pizarro, F. 2000. Niveles de sacarosa y relación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el cultivo *in vitro* de brotes de vid (*Vitis vinifera*) "Malaga Roja". Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de postgraduados. México. 78 p.

- Damiano C. 1980. Strawberry micropropagation. Proc. Conference Nursery Production of fruit plant through tissue culture application and feasibility. U.S.D.A. Agricultural Research results. pp. 11-22.
- Darnell R. L. and D. C. Ferree. 1983. The influence of environment on apple tree growth, leaf wax formation and foliar absorption. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108:506-511.
- Das, T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture 31:253-255.
- Debergh, P. C. and L. J. Maene. 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 14: 335-345.
- Dejardins, Y., A. Gosselin and S. Yerle. 1987. Acclimatization of *ex vitro* strawberry plantlets in CO<sub>2</sub> enriched environments and supplementary lighting. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112:5: 846-851.
- Donnelly, D. J. and W. E. Vidaver. 1984. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109:172-176.
- Dubé S. L. and W. E. Vidaver. 1992. Photosynthetic competence of plantlets grown and system for measurement of photosynthesis *in vitro*. Physiologia Plantarum. 84:409-416.
- Evaldson, I.E. and N.T. Welander, 1995. The effects of médium composition on in vitro propagation and in vivo growth of *Cordyline terminalis* cv. Atoom. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 60:4, 525-530.
- Fabbri, A., E. Sutter and S. K. Dunton. 1986. Anatomical changes in persistent leaves of tissue cultured strawberry plants after removal from culture. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 28:331-337.

- Ghashghaie, J., F Brenckman and B Saugier. 1992. Water relations and growth of roseplants cultured *in vitro* under various relative humidities. *Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture*. 30:51-57.
- George E.F. and P.D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Comercial Laboratorios Enegetic Limited. Great Britain. 690 pp.
- Ghashghaie, J., F Brenckman and B Saugier. 1992. Water relations and growth of roseplants cultured *in vitro* under various relative humidities. *Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture* 30:51-57.
- Granada, C. L. 1990. Manejo de plantas en invernadero. In: Fundamentos teóricos-prácticos del cultivo de tejidos vegetales V. M. Villalobos A. (ed). CP-FAO. Roma. Italia. pp 85-87.
- Gracián-Sandoval, S. y Miguel-Cruz, 1987. Propagación *in vivo* de mezcal tequilero (*Agave tequilana* Weber). En Anónimo (1987) III Reunión Nacional de Bioquímica y Cultivo de Tejidos Vegetales (resúmenes) Irapuato, Gto. Centro de Investigaciones Avanzadas del IPN, Unidad Irapuato. 14 p.
- Granados, S.D. Los Agaves en México. 1993 Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp 74-76.
- Groenewald, E.G., D.C.J. Wessels and A. Koleman. 1977. Cellus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an Agave species. *Z. Pflanzenhysiol.* Bd. 81:369-373.
- Guerrero A. J. R. 2000. Aclimatación de *Lilium longiflorum* con diferentes relaciones nutrimentales. Tesis de Maestro en Ciencias, especialidad en fruticultura, Colegio de Postgraduados. Montecillo, México. p 68.

- Hartmann, H. T., D.E. Kester, F.T.Davies, Jr., and R.L.Geneve 1997. Plant Propagation: Principles and Practices. Sixth edition. Prentice Hall. pp 71-72, 429-513.
- Hazra, S.K., Sudripta, Das and A.K. Das. 2002. Sisal plant regeneration by organogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 70:235-240.
- Hughes, K. W. 1980. Ornamental species. In: Cloning Agricultural Plants Via *in vitro* techniques. Conger, B. V. (ed) CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. pp 1-33
- Jeong J. , J. Lee and M. Roh. 1996. *In vitro* propagation of bulb scale section of several Korean native lilies. *Acta Horticulturae*. 414: 269-276
- Koevary K., L. Rappaport and L. L. Morris. 1978. Tissue culture propagation of head lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 13:39-41
- Kartosentono, S., Indrayanto, G., y Zaini, N.C. 2002. The uptake of copper by cells suspensión cultures of *Agave amaniensis*, and its effects on the growth, amino acid and hecogenin content. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 68:287-292.
- Kubota Ch. and N. C. Rajapakse. 1996. Low-Temperature storage of micropagated plantlets under selected light environments. . *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 31:449-452.
- Kunisaki, J.T. 1975. *In vitro* propagation of *Cordyline terminalis* (L.)Kurth. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 10:601-602.
- Laforge, F., C. Lussier, Y. Desjardins and A. Gosselin. 1991. Effect of light intensity and CO<sub>2</sub> enrichment during *in vitro* rooting on subsequent growth of strawberry, raspberry and asparagus in acclimatization. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 47:259-269.

- Lilien – Kipnis, H. and M. Kochba. 1987. Mass propagation of new gladiolus hybrids. *Acta Horticulturae*. 212:631-638.
- Lim, S., J. H. Seon, S. Son, B. Han and K. Paek. 1998. Effect of light, inorganic salts and growth retardants on bulblet formation in *Lilium*. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 39:1: 109-110.
- Linenberger D., R. 1983. Shoot proliferation, rooting and transplant survival of tissue. Cultured " Hally jolivette " cherry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 18:2: 182-185
- Lozoya, S. H. 1985. Micropropagación de especies herbáceas. In: El cultivo de tejidos vegetales en México. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. M. L. Robert y V. M. Loyola (eds) pp 65-79.
- Maesato K., L. Sharada, H. Fulkui, T. Hara and S. Sarma. 1994. *In vitro* bulblet regeneration from bulbscale explants of *Lilium japonium* Thunb. Effect of plant growth regulators and culture environment. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 69:289-297.
- Madrigal, L.R., G.M.R. Dorantes y J.L. Rodríguez de la O. 1981. Propagación *in vitro* de henequén (*Agave froucroydes* Lem.) Primer Simposio de Agave. Mérida, Yuc., K'tun-Cordemex. 12p
- Margara, J. 1988. Métodos de multiplicación *in vitro* En: Multiplicación Vegetativa y Cultivo *in vitro*. Los meristemas y la organogénesis. J. Margara 2ªed Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. pp 47-50
- Marino, G. 1983. Propagazione *in vitro* del susino cino-giapponese cv. " S. Rosa". Influenza di diverse componenti minerali e ormonal, su moltiplicazione e adicazione. *Riv. Ortoflorofruitt. It.* 67:349-361.

- McCarthy, J.J. and E.J. Staba, 1985. Morphogenesis in *Yucca schidigera* Roezl. Root organ cultures. *Ann. Bot.* 56:205-210.
- Mee, G.W.P. 1978. Propagation of *Cordyline terminalis* from callus culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 13:660.
- Montie J. L. 1981. Does light limit crop production. In *Physiological processes limiting plant productivity*. C. B. Johnson (ed) London Butterworths. pp 23-28.
- Nava, C.A. 1988. *Agave tequilana in vitro*: un modelo para el estudio de morfogénesis. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. México. p. 214
- Nikam, T.D. 1997. High frequency in *Agave sisalana*. *Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture* 51:225-228.
- Palonen, P. and D. Buszard. 1998. *In vitro* screening for cold hardiness of raspberry cultivars. *Plant Cell Tissue Culture and Organ Culture* 53:213-216.
- Parker, R. 2000. *La ciencia de las plantas*. Tompson editores Spain. pp256, 261.
- Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. De Mundi-Prensa, Madrid, España. pp 127-132.
- Preece, J. E. and E. G. Sutter. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: *Micropropagation*. Debergt, P. C. and R. H. Zimmerman (eds). Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 71-93.
- Podwyszynska, M., Olsewski, T. 1995. Influence of gelling agent on shoot multiplication and uptake of macroelements by *in vitro* cultura of *Rose cordyline* and homalomena. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 64:77-84.

- Powers, D.E., Backhaus R.A., 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell Tissue Cultura and Organ Culture* 16:67-60.
- Portillo M.L. 1997. Embriogénesis somática indirecta en *Agave tequilana* Weber. Efecto auxinas. En: *Gaceta universitaria. Desarrollan metodología para el mejoramiento genético del Agave*. Víctor González. Universidad de Guadalajara. 30 de Junio de 1997. pp 3-57.
- Quintero, A., V. Rosas, M. Baca y A. Romo de Vivar. 1980 Estudio de las condiciones de cultivo de células de *Yucca pilifera* y su cuantificación de sarsasapogenina. En: Anónimo (ed.) *Yucca*. Saltillo Coah., Centro de Investigaciones en Química Aplicada. Pp 223-227.
- Read, P. E. and C. D. Fellman, 1985. Accelerating acclimation of *in vitro* propagated woody ornamentals. *Acta Horticulturae* 166: 15-20.
- Reyes, T., T. A. Nell, J. E. Barret and Ch. A. Conover. 1996. Irradiance level and fertilizer rate effect acclimatization of *Chamaedorea elegans* Mart. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 31:839-842.
- Ritchie G. A., C. Boggiano, K. C. Short and MR. Davey. 1990. The effect of relative humidity on plant morphology and stomatal physiology of *in vitro* grown *Chysanthemum*. *Bull. Soc. Bot. Frnc.* 137:123-168.
- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora and A. Acosta-Dueñas, B. 1996. Somatic Embryogenesis of *Agave victoriana-reginae* Moore. *Plant Cell Tissue Cultura and Organ Culture* 46:85-87.
- Robert, M.L. ,Herrera, J.L. Contreras, F., Scorer, K.N. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. *Plant Cell Tissue Cultura and Organ Culture* 8:37-48.

- Rogers, M.N. and B. O. Tjia. 1990. Production and culture of cut gerberas In: Gerbera production. M. N. Rogers and B. O. Tjia (eds). Timber Press Grower Handbook Series. pp. 7-75.
- Rubluo, I.A. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological conservation*. 63: 163-169.
- Rugini E. and G. Fontanazza. 1981. *In vitro* propagation of "Dolce agogia" olive. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 16:492-49.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., (1997). Embriogénesis somática indirecta en *Agave tequilana* *in vitro* propagation of *Agave Parrasana* Berger. Plant Cell Tissue Cultura and Organ Culture 56:163-167.
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Pulido and H., Rodríguez-Garay, B.1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave Parrasana* Berger. Plant Cell Tissue Cultura and Organ Culture 56:163-167.
- Seibert, M. and P. G. Kadkade. 1982. Environmental factors: A: Light In: Plant tissue culture as a source of biochemicals, E. J. Staba (ed) Florida, CRC Press. Pp 123.
- Shackel, K. A., Novello, V. and Sutter, E. G. 1990. Stomatal function and cuticular conductance in whole tissue-cultured apple shoots. J. Am. Soc. Hort. Sci. 115:3:468-472.
- Skirvin R. M. and M. C. Chua. 1981. *In vitro* propagation of forever your rose. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 14:608-610
- Télez, M.E. 2003. Multiplicación *in vitro* de *Agave tequilana* Weber. Tesis de licenciatura. UNAM F.E.S. Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli. Estado de México. pp 51-68.

- Valenzuela, Z. A. 1994. El Agave Tequilero: Su cultivo e industrialización. Mosanto. México. 119 p.
- Velásquez-Mendoza J. y L. Z. Furcikovsky 2003. Abastecimiento Nutricional del Agave. Memorias del Centro de Investigaciones y Diseño del Estado de Jalisco. México.
- Vélez, G. C. 1997. Selección celular para resistencia a filtrados microbianos en *Agave tequilana* Weber. En: Gaceta Universitaria. Desarrollan metodología para el mejoramiento genético de *Agave*. Víctor González. Universidad de Guadalajara. 30 de Junio de 1997. pp3-54.
- Wardle, K. E., B. Dobbs and K. C. Short. 1983. *In vitro* acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108:386-389.
- Wulster G., H. W. Janes and H. Gude. 1997. Effects of supplemental light quality, quantity and differential temperature on growth and development of easter lily (*Lilium longiflorum*). Acta Horticulturae. 418:153-157.
- Yue, D. Y. Desjardins, M. Lamarre and A. Gosselin. 1992. Photosynthesis and transpiration of *in vitro* cultured asparagus plantlets. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 49:9-16.

## ANEXO

**Anexo 1.** Significancia de los ANOVAS de las variables número de hojas, longitud de hoja, volumen de planta y longitud de raíz de tratamientos de concentración de n-p-k en plantas de *Agave tequilana* obtenido *in vitro*, durante la fase de aclimatación a las 12 semanas después del transplante.

	Número de hojas	Longitud de hoja	Volumen de planta	Longitud de raíz	F Tablas	
					0.05	0.01
Cuadrado Medio	0.984375	1.028317	1.028002	2.875441	1.88	2.41
F Calculada	0.578740157	0.351156	4.525234	5.938836		
Significancia	NS	NS	**	**		

**Anexo 2.** Composición química del medio nutrimental Cruz-Pizarro utilizado en la propagación *in vitro* de *Agave tequilana* Weber cv. azul .

<b>COMPUESTO QUÍMICO</b>	<b>Sales minerales mg•L-1</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	200
KNO <sub>3</sub>	1010
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> &4H <sub>2</sub> O	295
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
MgSO <sub>4</sub> & 7 H <sub>2</sub> O	369
Fe SO <sub>4</sub> & 7 H <sub>2</sub> O	25
Na - Edta	38
Mn SO <sub>4</sub> & H <sub>2</sub> O	0.84
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> & 2 H <sub>2</sub> O	0.24
Zn SO <sub>4</sub> & 7 H <sub>2</sub> O	8.6
Cu SO <sub>4</sub> & 5 H <sub>2</sub> O	0.0000249
CoCl <sub>2</sub> &6 H <sub>2</sub> O	0.0000238
Mio-inositol	100
Tiamina. HCl	0.1
Pirodoxina. HCl	0.5
Ácido nicotínico	0.5
AIB	0.1
BA	0.5
Sacarosa	30000
Agar	6000

El pH es ajustado a 5.7

**Anexo 3.** Distribución de unidades experimentales de *Agave tequilana* cv. azul obtenido *in vitro*, bajo diferentes concentraciones N-P-K, durante la fase de aclimatación.

T9R5	T4R7	T5R1	T2R6	T9R6	T12R6	T3R8	T12R5
T1R1	T8R1	T8R3	T6R1	T1R6	T6R2	T8R7	T13R7
T13R4	T10R1	T5R5	T8R4	T7R7	T7R6	T11R5	T1R7
T3R1	T10R2	T2R4	T4R1	T3R5	T2R5	T8R8	T6R7
T5R4	T9R1	T7R2	T8R6	T6R4	T8R5	T4R6	T10R8
T8R2	T2R1	T13R1	T3R4	T1R3	T4R4	T10R6	T5R8
T2R2	T12R8	T6R5	T5R2	T7R4	T9R7	T6R8	T4R8
T10R4	T13R8	T2R7	T10R5	T5R6	T7R5	T1R8	T9R4
T12R1	T7R1	T9R2	T3R2	T9R3	T5R7	T7R8	T13R6
T11R1	T13R5	T4R3	T11R4	T3R7	T6R6	T9R8	T2R8
T4R2	T11R2	T11R3	T1R5	T10R7	T6R3	T3R6	T12R4
T13R2	T13R3	T7R3	T2R3	T5R3	T11R7	T12R3	T4R5
T3R3	T1R2	T10R3	T11R8	T12R2	T1R4	T12R7	T11R6