

## VITROPLANTAS DE *Agave angustifolia* HAW. OBTENIDAS EN AMBIENTES DE INCUBACIÓN CONTRASTANTES, ACLIMATADAS EN DIFERENTES SUSTRATOS

### VITROPLANTS OF *Agave angustifolia* HAW. OBTAINED IN CONTRASTING INCUBATION ENVIRONMENTS, ACCLIMATED ON DIFFERENT SUBSTRATES

José Raymundo Enríquez-del Valle, Ilse Lizbeth Chávez-Cruz, Gerardo Rodríguez-Ortiz\* y Gisela Virginia Campos-Angeles

Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Ex hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca, México.

\*Autor de correspondencia (gerardo.ro@voaxaca.tecnm.mx)

#### RESUMEN

Las especies del género *Agave* se usan para obtener fibras y azúcares. En Oaxaca, México, hay 10 mil hectáreas cultivadas con diversas especies de este género, y 80 % de esta área es cultivada con *A. angustifolia* Haw. Las plantaciones se establecen con plantas propagadas asexualmente, provenientes de estructuras como vástagos de rizomas, bulbilos de inflorescencias y plantas obtenidas mediante micropropagación. El ambiente de cultivo *in vitro* afecta las características fisiológicas y morfológicas de las plantas micropropagadas y su adaptación a las condiciones *ex vitro*. El objetivo de este estudio fue determinar la influencia del ambiente de incubación y del sustrato utilizado para la aclimatación de las plantas de *A. angustifolia* obtenidas *in vitro* sobre su supervivencia, características morfológicas y crecimiento. Brotes adventicios se enraizaron en laboratorio con iluminación LED. Las plantas regeneradas se cultivaron durante 31 días en dos ambientes de incubación, laboratorio con iluminación LED o estructura de sombra parcial. Para su aclimatación, las plantas se transfirieron a sustratos que contenían turba (T) y perlita (P) en proporciones 50T:50P, 25T:75P y 0T:100P, permaneciendo durante 65 días dentro una estructura con sombra parcial y 30 días en un vivero. Después de 65 días de aclimatación, 100 % de las plantas provenientes tanto de los cultivos *in vitro*, incubados tanto en la estructura de sombra parcial como en el laboratorio, sobrevivieron cuando se establecieron en el sustrato 50T:50P. Al término de la aclimatación, las plantas originadas de cultivos incubados en la estructura de sombra parcial, que crecieron en el sustrato 0T:100P, tuvieron mayor diámetro de tallo, número de raíces, volumen de raíces, peso seco aéreo y de raíz, y menor altura, número de hojas y área foliar que las plantas provenientes de cultivos *in vitro* incubados en el laboratorio.

**Palabras clave:** *Agave angustifolia*, iluminación LED, micropropagación, sustratos

#### SUMMARY

*Agave* species are used to obtain fibers and sugars. In Oaxaca, Mexico, there are 10 thousands hectares cultivated with various species of this genus, and 80 % of this area is cultivated with *A. angustifolia* Haw. Plantations are established with asexually propagated plants, coming from structures such as rhizome sections, inflorescence bulbils and plants obtained by micropropagation. The *in vitro* culture environment affects the physiological and morphological characteristics of micropropagated plants, and their

adaptation to *ex vitro* conditions. The aim of this study was to determine the influence of the incubation environment and the substrate used for the acclimatization of *A. angustifolia* plants obtained *in vitro*, on their survival, morphological characteristics and growth. Adventitious shoots were rooted in the lab with LED lighting. Regenerated plants were grown for 31 days in two incubation environments, laboratory with LED lighting or partial shade structure. For acclimation, the plants were transferred to substrates containing peat (T) and perlite (P) in proportions 50T:50P, 25T:75P and 0T:100P, remaining for 65 days in a structure with partial shade and 30 days in a nursery. After 65 days of acclimatization, 100 % of the plants from both *in vitro* cultures incubated in the partial shade structure and in the laboratory, survived when they were established in 50T:50P substrate. At the end of acclimatization, plants originating from cultures incubated in the partial shade structure, which grew in the 0T:100P substrate, had larger stem diameter, number of roots, root volume, aerial and root dry weight, and lower height, number of leaves and leaf area than plants from *in vitro* cultures incubated in laboratory.

**Index words:** *Agave angustifolia*, LED lighting, micropropagation, substrates

#### INTRODUCCIÓN

En el estado de Oaxaca, México, el *Agave angustifolia* Haw. ocupa 80 % de las 10 mil ha cultivadas con agaves. De esta especie se obtienen fibras y azúcares, y es materia prima para elaborar mezcal (Jarquín-Rosales *et al.*, 2022). Las plantaciones de *A. angustifolia* se establecen con plantas obtenidas de propágulos vegetativos, como vástagos de rizomas y bulbilos de inflorescencia (Enríquez, 2008; Garnica-García *et al.*, 2020; Sánchez *et al.*, 2020). También se han desarrollado protocolos para la micropropagación de *A. angustifolia* (Arzate-Fernández *et al.*, 2016; Enríquez *et al.*, 2005; 2018), así como en *A. tequilana* (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006), *A. fourcroydes* (Abreu *et al.*, 2007; Garriga *et al.*, 2010), *A. sisalana* (Nikam *et al.*, 2003) y *A. potatorum* (Bautista-Castellanos *et al.*, 2020).

En los esquemas de micropropagación, las plantas son

transferidas en la etapa de aclimatación de las condiciones *in vitro* a contenedores con sustrato y ambiente de invernadero, para que éstas desarrollen características morfológicas y fisiológicas que les permitan adaptarse al ambiente *ex vitro* y reinicien su crecimiento. Durante la aclimatación se controlan condiciones ambientales como: 1) sustrato, que debe tener buen drenaje y retención de humedad para permitir el desarrollo de raíces eficientes para la absorción de nutrientes y agua (Sánchez *et al.*, 2020); 2) humedad relativa, que debe ser alta al inicio de la aclimatación y en el transcurso de 90 días debe reducirse en forma gradual; 3) temperatura, en el intervalo de 15 a 28 °C; 4) radiación solar, que al inicio de la aclimatación debe ser baja (300-400  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y en el transcurso de la misma se incrementa gradualmente (Enríquez-del Valle *et al.*, 2016); 5) abastecimiento nutrimental, en plantas de *A. angustifolia* micropropagadas se ha determinado que la cantidad de nutrimentos proporcionados mediante fertirriego debe ser de acuerdo con el sustrato utilizado (Enríquez, 2018; Enríquez-de Valle *et al.*, 2009; 2021). Dado que los ambientes *in vitro* y *ex vitro* son contrastantes, debe haber una adecuada transición de las condiciones que predominan *in vitro* a las del invernadero o campo (Enríquez-del Valle *et al.*, 2021).

Cruz *et al.* (2017) observaron que las plantas de *Agave americana* var. *oaxacensis* micropropagadas tenían hojas delgadas de consistencia herbácea y flácidas al inicio de su aclimatación, y durante las primeras tres a cuatro semanas de este periodo no crecieron, e incluso disminuyó la cantidad de hojas, debido a la senescencia gradual y muerte de las hojas que la planta había formado *in vitro*. Las hojas fueron reemplazadas por otras nuevas, más grandes en longitud, ancho y grosor, de consistencia herbácea pero más rígidas y características relacionadas con su adaptación. En las hojas que murieron no ocurrieron los cambios morfológicos y fisiológicos que implica la adaptación al ambiente *ex vitro*.

En *Musa* (Da Silva *et al.*, 2005) y *Agave americana* var. *oaxacensis* (Miguel *et al.*, 2013), los brotes regenerados fueron enraizados *in vitro* en presencia de radiación solar disminuida al 50 % mediante malla sombra, para su pre-aclimatación. Cuando las plantas se extrajeron del cultivo *in vitro* y se establecieron en sustrato e invernadero para su aclimatación, mayor número de éstas sobrevivió; la mayor parte de sus hojas fueron menos propensas a senescencia y tuvieron mayor actividad fotosintética y cutícula cerosa.

El objetivo de este estudio fue determinar la influencia del ambiente de incubación y del sustrato utilizado para la aclimatación de las plantas de *A. angustifolia* obtenidas *in vitro*, sobre su supervivencia, características morfológicas y crecimiento.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio experimental y material genético

El estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y en una estructura con sombra parcial, del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, localizado en el municipio de Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México.

Brotos de *A. angustifolia* de 3.5 a 4.5 cm de altura, obtenidos por organogénesis, se colocaron en frascos de 160 cm<sup>3</sup> (dos brotes por frasco) con 20 mL de medio de cultivo para inducir la formación de raíces.

### Medio de cultivo y manejo del material en laboratorio

El medio de cultivo contenía las sales basales de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) al 100 %, 1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 25 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-acético (AIA). El pH se ajustó a 5.8 antes de agregar 5.7 g L<sup>-1</sup> de agar. Los cultivos se incubaron cuatro semanas en el laboratorio con 16 h de iluminación LED (35  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y temperatura entre 16 y 28 °C. Durante este tiempo todos los brotes formaron raíces adventicias y posteriormente se separaron en dos grupos, cada uno de 90 plantas. El primer grupo continuó su desarrollo en las condiciones de laboratorio descritas, y el segundo se llevó a una estructura donde estuvieron expuestas a fotoperiodo natural con radiación solar disminuida mediante malla sombra (estructura con sombra parcial) en la cual a las 12:00 h del día la intensidad fue de 400  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Bajo estas condiciones las plantas en cultivo *in vitro* permanecieron 31 días; después de este tiempo, las plantas micropropagadas en ambas condiciones de incubación (180) se extrajeron de los frascos y se lavaron con agua potable para retirar residuos del medio de cultivo. Diez plantas de cada grupo se eligieron al azar y se evaluó su altura, cantidad de raíces y número de hojas desplegadas. Los datos de ambos grupos se compararon mediante la prueba de *t* de Student para dos muestras independientes (*t*,  $P \leq 0.05$ ).

### Etapas de aclimatación

Todas las plantas para su aclimatación se transfirieron a charolas de 54 × 28 × 6 cm divididas en 50 cavidades de 70 cm<sup>3</sup>, que contenían mezclas de turba (T) y perlita (P), en tres proporciones diferentes: 50:50, 25:75 y 0:100. Se estableció una planta en cada cavidad y 30 plantas por tratamiento. Las plantas en charolas estuvieron 65 días dentro de una estructura con sombra parcial con 80 a 90 % de humedad relativa y radiación solar que al medio día era de 300 a 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las plantas se irrigaron dos

veces al día de manera intermitente (12 s con intervalos de 10 min) por nebulización y dos veces por semana se les aplicó solución nutritiva Steiner (1984) al 50 % de su concentración.

A partir del día 66 y hasta el día 95, las plantas de todos los tratamientos se colocaron en un vivero con radiación solar disminuida a 40 % ( $640 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) mediante una malla sombra, temperatura de 14 a 28 °C y humedad relativa de 60 %. Las plantas ya no recibieron riego por nebulización, pero sí a nivel sustrato.

### Diseño y unidad experimental

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial  $2 \times 3$  (dos condiciones de incubación y tres mezclas de sustrato), generando seis tratamientos. La unidad experimental fue una planta. Los porcentajes de supervivencia se calcularon con base en las 30 plantas separadas en seis unidades experimentales de cinco plantas en cada tratamiento.

### Variables evaluadas

Se tomaron datos en tres fechas: 1) al inicio de la aclimatación se cuantificó la altura en cm, número de hojas y número de raíces; 2) en el día 65 de aclimatación, cuando las plantas se transfirieron de la estructura con sombra parcial al vivero, se tomaron datos de las variables citadas, y en cada tratamiento se determinó el porcentaje de plantas que sobrevivieron y el ancho de la hoja más grande en mm; 3) a los 95 días de aclimatación, además de las variables antes mencionadas, se registró el diámetro de tallo en mm y la longitud de raíz en cm, y a seis plantas de cada tratamiento se les determinó el volumen de la raíz en  $\text{cm}^3$  por desplazamiento de agua en una probeta de 25 mL. En esta etapa no se evaluó el porcentaje de supervivencia porque ya no ocurrió mortandad de las plantas. En seis plantas por tratamiento se determinó el área foliar en  $\text{cm}^2$ , las hojas se desprendiendo del tallo, se digitalizó su imagen y ésta se procesó en el software ImageJ (Microsoft Java 1.1.4, <https://imagej.net/ij/features.html>); también se determinó el peso seco de la raíz y de la parte aérea (tallo + hojas) ambas en g.

La altura, diámetro de tallo, número de hojas, ancho de la hoja más grande, número de raíces, longitud de la raíz más larga se evaluaron en 12 plantas (repeticiones) por tratamiento tomadas al azar. La determinación del volumen de raíz, peso seco de raíz, peso seco aéreo (tallo + hojas) y área foliar se llevó cabo en seis plantas por tratamiento.

### Análisis estadístico

Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ). Para analizar los porcentajes de plantas que sobrevivieron, los datos se transformaron con la función arcoseno. Las rutinas de los análisis estadísticos se realizaron con el programa computacional Sistema de Análisis Estadístico (SAS Institute, 2004).

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las primeras plantas micropropagadas de *Agave angustifolia* se obtuvieron en 1986, éstas se transfirieron a contenedores con sustrato y aclimataron durante 60 días en invernadero, después estuvieron un año en vivero y luego se establecieron en campo (Enríquez, 2008). La micropropagación de *Agave angustifolia* se ha realizado mediante embriogénesis somática (Arzate-Fernández *et al.*, 2016), en *Agave potatorum* se indujo la formación de brotes adventicios en medios de cultivo semisólidos (Bautista-Castellanos *et al.*, 2020); en *A. tequilana*, se indujo la embriogénesis somática en medios de cultivo líquidos utilizando sistemas de inmersión temporal (Portillo y Santacruz-Ruvalcaba, 2006); lo anterior muestra que es posible aplicar innovaciones en las diversas etapas de micropropagación para mejorar la eficiencia de propagación, supervivencia y calidad de las plantas.

Las plantas de agave obtenidas de cultivos *in vitro* incubados en el laboratorio y las plantas obtenidas de cultivos *in vitro* incubados en una estructura de sombra parcial, al inicio de la aclimatación mostraban características morfológicas significativamente diferentes ( $t$ ,  $P \leq 0.05$ ), 7.0 y 5.9 cm de altura, 3.0 y 2.5 raíces, 2.3 y 2.1 hojas desplegadas, respectivamente. A los 65 días de aclimatación, del 86.6 a 100 % de las plantas provenientes de los cultivos *in vitro* incubados en laboratorio con iluminación LED (Figura 1A) y de 80 a 100 % de las plantas provenientes de cultivos *in vitro* incubados en una estructura de sombra parcial (Figura 1B) se aclimataron al ambiente *ex vitro* (Figura 1C).

Los análisis de varianza indicaron que el ambiente de incubación (AI) del que provenían las plantas tuvo efecto significativo sobre la altura de la planta, mientras que el tipo de sustrato afectó significativamente el número de hojas, altura de la planta y ancho de la hoja. La interacción entre el ambiente de incubación *in vitro* y sustrato de aclimatación tuvo efecto significativo sobre el número de hojas (Cuadro 1). Todas las plantas provenientes de cultivos *in vitro* incubados en laboratorio o en una estructura de sombra parcial, que se transfirieron al sustrato 50T:50P, se adaptaron a las condiciones *ex vitro* (Cuadro 2). Las



plantas obtenidas de cultivos *in vitro* incubados en una estructura de sombra parcial, establecidas en el sustrato 25T:75P, sobrevivieron en un 80 % después de 65 días de aclimatación. Las plantas de los diversos tratamientos tuvieron de 4.0 a 5.1 hojas, de 8.6 a 11.1 mm de ancho de la hoja y de 11.0 a 14.6 cm de altura de la planta (Cuadro 2).

A los 95 días de aclimatación en vivero (expuestas a mayor irradiancia), el ambiente de incubación del que provenían las plantas tuvo efectos altamente significativos en el número de hojas, altura de la planta y longitud de la raíz. El factor sustratos afectó significativamente la altura de la planta, diámetro del tallo, volumen de la raíz, peso seco de raíz, peso seco de la parte aérea y longitud de la raíz. La interacción de los ambientes de incubación y los sustratos mostró efecto significativo en la longitud de raíz, volumen de raíz, área foliar y peso seco de la parte aérea

(Cuadro 2). Al término de la aclimatación las plantas tenían de 4.5 a 5.8 hojas, de 10.8 a 12.3 mm de ancho de la hoja, de 12.5 a 16.8 cm de altura, 7.4 a 9.0 mm diámetro de tallo, de 5.3 a 8.2 raíces y las raíces de 3.5 a 4.3 cm de longitud (Cuadro 3).

En la aclimatación de plantas de *A. marmorata* micropropagadas, 100 % de éstas sobrevivió cuando se establecieron en sustrato de turba-perlita (1:1) o turba-arena de río (1:1), mientras que sólo sobrevivió 72.4 % de las plantas establecidas en un sustrato a base de perlita, 38.7 % arena de río y 35.7 % de grava volcánica (tezontle) (Aguilar y Rodríguez, 2018); asimismo, 100 % de las plantas de *A. marmorata* micropropagadas se adaptaron cuando estuvieron en macetas con grava volcánica (tepojal) en un sistema semi-hidropónico; estas plantas tuvieron mejor desarrollo que aquellas cultivadas en un sustrato



Figura 1. Propagación *in vitro* de *Agave angustifolia*. A) Cultivos *in vitro* incubados en laboratorio con iluminación LED, B) cultivos *in vitro* incubados en una estructura con radiación solar disminuida con malla sombra, C) plantas micropropagadas establecidas en diversos sustratos, aclimatadas durante 95 días dentro del vivero.

Cuadro 1. Cuadros medios y significancia estadística del análisis de varianza de las variables evaluadas en *A. angustifolia* micropropagadas, establecidas en diferentes sustratos, con aclimatación de 65 días dentro de estructura con sombra parcial.

FV	GL	S	NH	ALT	AH
Trat	5	530.13**	1.78**	19.09**	11.23**
Al	1	78.38 <sup>ns</sup>	0.88 <sup>ns</sup>	58.32**	0.70 <sup>ns</sup>
Sust	2	880.85**	2.18**	17.47**	23.53**
Al x Sust	2	380.29 <sup>ns</sup>	1.84*	1.10 <sup>ns</sup>	4.21 <sup>ns</sup>
Error	66	139.196	0.48	2.58	2.67
Total	71				

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, Al: ambientes de incubación, Sust: sustratos, S: supervivencia (datos transformados), NH: número de hojas, ALT: altura de la planta, AH: ancho de la hoja. \*Significancia con  $P \leq 0.05$ , \*\*Significancia con  $P \leq 0.01$ , ns: no significativo.

**Cuadro 2. Cuadrados medios y significancia estadística del análisis de varianza de las variables evaluadas en *A. angustifolia* micropropagadas, establecidas en diferentes sustratos, con aclimatación del día 66 al 95 en vivero.**

FV	GL	NH	AH	ALT	DT	NR	LR	VR	PSR	PSA	AF
Trat	5	2.35**	5.00 <sup>ns</sup>	23.16**	5.16**	1.58 <sup>ns</sup>	16.82**	0.21**	0.0017**	0.026**	309.82**
Al	1	8.00**	2.50 <sup>ns</sup>	63.84**	2.46 <sup>ns</sup>	0.34 <sup>ns</sup>	19.11**	0.08 <sup>ns</sup>	0.000 <sup>ns</sup>	0.015 <sup>ns</sup>	253.87 <sup>ns</sup>
Sust	2	0.34 <sup>ns</sup>	4.54 <sup>ns</sup>	18.88**	9.51**	0.05 <sup>ns</sup>	11.88*	0.28**	0.003**	0.035**	120.53 <sup>ns</sup>
Al × Sust	2	1.54 <sup>ns</sup>	6.69 <sup>ns</sup>	7.09 <sup>ns</sup>	2.16 <sup>ns</sup>	3.72 <sup>ns</sup>	20.61**	0.20**	0.00 <sup>ns</sup>	0.024**	527.08**
Error	66	0.68 <sup>ns</sup>	3.11 <sup>ns</sup>	4.15 <sup>ns</sup>	0.95 <sup>ns</sup>	0.83 <sup>ns</sup>	3.24 <sup>ns</sup>	0.035	0.0002	0.004	81.41
Total	71										

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, Al: ambientes de incubación, Sust: sustratos, NH: número de hojas, AH: ancho de la hoja, ALT: altura de la planta, DT: diámetro de tallo, NR: número de raíces, LR: longitud de la raíz, VR: volumen de raíz, PSR: peso seco de raíz, PSA: peso seco parte aérea, AF: área foliar. \*Significancia con  $P \leq 0.05$ , \*\*Significancia con  $P \leq 0.01$ , ns: no significativo.

compuesto por tierra agrícola y perlita en proporción 1:1. Las plantas alcanzaron 7 cm de altura, 6 hojas, 15 mm de diámetro de tallo, 10 raíces con longitud de 9.5 cm (Álvarez-Aragón *et al.*, 2020). Plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas sobrevivieron de 87 a 97 % cuando se establecieron en perlita (100 %) y fueron irrigadas diariamente con solución nutritiva Steiner (Enríquez-del Valle *et al.*, 2021).

Las características físicas y químicas del sustrato son importantes para la adaptación y desarrollo de las plantas micropropagadas en la etapa de aclimatación. El sustrato proporciona soporte a la planta y debe proveer condiciones estables de aireación, retención de humedad y drenaje, así como capacidad de intercambio catiónico (Lazcano-Bello *et al.*, 2021). Se deben conocer las características que poseen materiales orgánicos e inertes como base para la preparación de un sustrato que posea propiedades físicas, químicas y biológicas apropiadas (Cruz *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2017). La turba es un sustrato que destaca por su alta retención de humedad y porosidad (88-91 %) (Núñez, 2009), además de contener nutrientes como nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio y azufre, donde están más disponibles en relación con otros sustratos (Benavides *et al.*, 2016). La perlita es un material inerte constituido por 85 a 96 % de espacios porosos, de los cuales 35 % son espacios de retención de humedad, y el resto de aireación, motivo por el cual este material se usa frecuentemente en las mezclas de sustratos.

Después de 95 días de aclimatación, las plantas de *A. angustifolia* provenientes de cultivo *in vitro* incubadas en laboratorio y establecidas en sustrato 50T:50P mostraron los valores más altos en ancho de la hoja mayor (12.3 mm), área foliar (52.6 cm<sup>2</sup>) y altura de la planta (16.8 cm), pero sin diferencias significativas con las plantas de otros tratamientos provenientes de la misma condición de incubación. Las plantas de cultivo *in vitro* incubadas

en una estructura con sombra parcial y establecidas en perlita (100 %) tuvieron el mayor diámetro de tallo (9.0 mm), número de raíces (8.2), volumen de raíz (0.9 cm<sup>3</sup>), peso seco de raíz (0.09 g) y peso seco de la parte aérea (0.4 g) que las plantas cultivadas en tezontle-perlita 25:75 (Cuadro 3).

El sustrato y el abastecimiento nutrimental son condiciones importantes para la aclimatación de las plantas micropropagadas. En *A. americana* var. *oaxacensis* se observó que las vitroplantas que permanecieron en aclimatación por 290 días en dos mezclas de sustratos (turba 66.6 % + arena 33.3 %, y turba 75 % + arena 25 %), fertirrigadas con solución nutritiva Steiner, tenían 5.6 y 5.5 hojas, tallos de 2.5 y 2.4 cm de diámetro, área foliar de 122.7 y 112 cm<sup>2</sup>, y peso seco de raíz de 1.7 y 1.4 g, respectivamente (Cruz *et al.*, 2019).

Las plantas micropropagadas se obtienen en condiciones controladas, con medios de cultivo que contienen concentraciones altas de azúcares, nutrientes y reguladores de crecimiento; además, se encuentran en recipientes cerrados con humedad relativa alta, temperaturas constantes, bajo intercambio de gases y crecimiento heterótrofo debido a la baja intensidad de luz dentro del cuarto de crecimiento (Silva *et al.*, 2018; Xiao *et al.*, 2011). Las plantas que crecen en estas condiciones tienen hojas delgadas de consistencia herbácea, con pobre desarrollo de cutícula y sus raíces pueden llegar a ser ineficientes; asimismo, estas plantas, presentan baja actividad fotosintética y sus estomas son poco funcionales en cuanto a su apertura y cierre, además de que tienen control mínimo de la transpiración. Estas características en las plantas micropropagadas limitan su supervivencia cuando se transfieren al ambiente *ex vitro*, donde imperan condiciones de humedad relativa baja, mayor intensidad lumínica, variaciones de temperatura en intervalos más amplios y menor disponibilidad de nutrientes, como se

**Cuadro 3. Características de las vitroplantas de *A. angustifolia*, con 65 días de su aclimatación dentro de una estructura con sombra parcial y de los 66 a los 95 días, en un vivero.**

AI	Sust T:P (%)	S (%)	NH	AH (mm)	ALT (cm)		
65 días de aclimatación							
LAB	50:50	100.0 a	4.8 ± 0.6 ab	9.8 ± 1.0abc	14.6 ± 1.9a		
LAB	25:75	93.3 ab	4.8 ± 0.7ab	8.6 ± 1.7c	13.3 ± 1.4a		
LAB	0:100	86.6 ab	4.5 ± 0.7ab	10.7 ± 1.7ab	14.3 ± 1.1a		
INV	50:50	100.0 a	5.1 ± 0.8a	9.0 ± 1.7bc	12.7 ± 2.0ab		
INV	25:75	80.0 b	4.0 ± 0.4 b	9.5 ± 2.3abc	11.0 ± 1.9b		
INV	0:100	93.3 ab	4.4 ± 0.9ab	11.1 ± 1.0a	12.9 ± 0.9ab		
95 días de aclimatación							
AI	SustT:P (%)	NH	AH (mm)	ALT (cm)	DT (mm)	NR	
LAB	50:50	5.5 ± 0.8a	12.3 ± 1.4a	16.8 ± 1.8a	8.3 ± 1.1ab	7.6 ± 1.1a	
LAB	25:75	5.8 ± 0.6a	10.9 ± 1.1a	15.2 ± 2.1a	8.0 ± 1.0ab	7.3 ± 1.9ab	
LAB	0:100	5.3 ± 0.8ab	11.6 ± 2.0a	15.4 ± 1.8a	8.7 ± 0.7a	7.1 ± 1.9ab	
INV	50:50	5.2 ± 0.9ab	10.8 ± 2.1a	14.4 ± 2.6ab	7.5 ± 1.1b	5.4 ± 1.9b	
INV	25:75	4.5 ± 0.9b	11.0 ± 2.3a	12.5 ± 2.0b	7.4 ± 0.7b	5.3 ± 1.3b	
INV	0:100	4.9 ± 0.9ab	12.0 ± 1.5a	14.7 ± 1.8ab	9.0 ± 1.1a	8.2 ± 1.6a	
		LR (cm)	VR (cm <sup>3</sup> )	AF (cm <sup>2</sup> )	PSR (g)	PSA (g)	
LAB	50:50	4.3 ± 1.0a	0.7 ± 0.2a	52.6 ± 5.6 a	0.05 ± 0.2bc	0.3 ± 0.03a	
LAB	25:75	4.0 ± 0.9a	0.7 ± 0.1a	50.5 ± 7.9 a	0.06 ± 0.008abc	0.3 ± 0.08a	
LAB	0:100	3.5 ± 0.9a	0.7 ± 0.3a	40.9 ± 8.9 ab	0.07 ± 0.01ab	0.3 ± 0.06a	
INV	50:50	3.5 ± 0.7a	0.6 ± 0.1ab	44.3 ± 12.0 ab	0.06 ± 0.02bc	0.3 ± 0.06a	
INV	25:75	3.6 ± 1.3a	0.3 ± 0.1b	33.7 ± 7.0b	0.04 ± 0.01c	0.2 ± 0.06b	
INV	0:100	4.3 ± 0.6a	0.9 ± 0.2a	50.1 ± 11.1 a	0.09 ± 0.02a	0.4 ± 0.08a	

AI: ambiente de incubación, Sust: sustrato, S: porcentaje de supervivencia, LAB: laboratorio, INV: estructura de sombra parcial, NH: número de hojas, AH: ancho de la hoja, ALT: altura de la planta, DT: diámetro de tallo, NR: número de raíces, LR: longitud de la raíz, VR: volumen de la raíz, PSR: peso seco de la raíz, PSA: peso seco parte aérea, AF: área foliar. Medias con letras iguales en cada columna y cada variable no son estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

observó en *A. tequilana* (Rescalvo-Morales *et al.*, 2019), *Passiflora edulis* (Manokari y Shekhawat, 2017) y *Genuina avellana* (Alvarez *et al.*, 2012). En la presente investigación, al inicio de la aclimatación, las plantas obtenidas de cultivos *in vitro* incubados en laboratorio presentaban mayor cantidad y tamaño de raíces que las incubadas en la estructura de sombra parcial, pero estas últimas presentaban hojas más rígidas y gruesas con espinas en los bordes.

Las plantas de agave micropropagadas, durante su aclimatación desarrollan nuevas hojas con estomas

funcionales para el control de la transpiración y de ceras epicuticulares que evitan la pérdida de agua; asimismo, forman raíces más eficientes y cambian su metabolismo de C<sub>3</sub> a CAM (Rescalvo-Morales *et al.*, 2019). Modificando gradualmente las condiciones ambientales de incubación de los cultivos *in vitro* al reducir la humedad relativa, incrementar la intensidad, calidad y tiempo de exposición a la luz durante la incubación, es posible inducir que las plantas desarrollen metabolismo autótrofo (Alvarez *et al.*, 2012; Schmildt *et al.*, 2015); entonces, exponer los cultivos *in vitro* a radiación solar disminuida, como una condición de pre-adaptación, ocasiona que las plantas micropropagadas



adquieran características morfológicas y fisiológicas que podrían mejorar su adaptación al ambiente *ex vitro* (Alvarez *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2021; Pospíšilová *et al.*, 2007). La luz, además de ser fuente de energía que se aprovecha durante los procesos fotosintéticos y acumulación de biomasa, es un factor determinante para el desarrollo de las plantas al intervenir en la fotomorfogénesis (Arena *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Los resultados de la presente investigación muestran que las condiciones de incubación a las que se expongan las vitroplantas antes de que sean trasplantadas al suelo afectan sus características morfológicas y su capacidad de adaptación a las condiciones *ex vitro*. Incubar los cultivos *in vitro* dentro de una estructura con sombra parcial, donde se expongan a radiación solar disminuida, podría ser una condición que reduzca los costos de producción de las vitroplantas.

Martins *et al.* (2015) evaluaron el crecimiento de plantas micropropagadas de *Neoregelia concentrica* expuestas a diferentes niveles de irradiancia (30, 50, 70 y 100 % de radiación solar) durante su aclimatación. Estos autores observaron que sólo 67 % de las plantas que permanecieron en 100 % de radiación solar sobrevivió, mientras que todas aquellas que se mantuvieron en 30 y 70 % de irradiancia se adaptaron. El incremento en el nivel de irradiancia de 30 a 70 % provocó que las plantas formaran más hojas, área foliar, peso fresco de la parte aérea y masa seca total.

### CONCLUSIONES

Las plantas de *Agave angustifolia* provenientes de cultivos *in vitro* que permanecieron en condiciones de laboratorio con iluminación LED durante 31 días alcanzaron mayor altura que las incubadas en la estructura de sombra parcial. El mejor sustrato para aclimatación fue la mezcla a base de 50 % turba y 50 % perlita, permitiendo que 100 % de las plantas sobrevivieran. Después de 95 días de aclimatación, las plantas provenientes de cultivos *in vitro* incubadas en laboratorio fueron 13.5 % más altas, con 13 % más hojas y con raíces 16 % más largas que las crecidas en la estructura de sombra parcial. Los resultados indican que es factible incubar los cultivos *in vitro* en una estructura o invernadero con radiación solar disminuida, sin afectar significativamente la calidad de las plantas, incrementando con ello su adaptación al ambiente *ex vitro* y reduciendo el uso de iluminación artificial, consumo de energía eléctrica y costos de producción.

### AGRADECIMIENTOS

Los datos del presente artículo se obtuvieron en el proyecto "Propagación asexual de agaves" financiado por el Tecnológico Nacional de México, con clave: 13746.22-P. También se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y

Tecnología, CONACyT, México, por su apoyo a la primera autora con una Beca Nacional para estudios de posgrado (1082567).

### BIBLIOGRAFÍA

- Abreu E., G. González, R. Ortiz, P. Rodríguez, R. Domech y M. Garriga (2007) Evaluación de vitroplantas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem) durante la fase de aclimatación. *Cultivos Tropicales* 28:5-11.
- Aguilar J. D. y J. L. Rodríguez O (2018) Micropropagación y aclimatación de maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roetzl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana de Biotecnología* 20:124-131, <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084>
- Alvarez C., P. Sáez, K. Sáez, M. Sánchez-Olate and D. Ríos (2012) Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Genuvina avellana* mol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 110:93-101, <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0133-x>
- Álvarez-Aragón C., A. M. Arzate-Fernández, S. Y. Martínez-Martínez e I. Martínez-Velasco (2020) Regeneración de plantas de *Agave marmorata* Roetzl, vía embriogénesis somática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 23:36, <https://doi.org/10.56369/tsaes.3117>
- Arena C., T. Tsonev, D. Doneva, V. De Micco, M. Michelozzi, C. Brunetti, ... and F. Loreto (2016) The effect of light quality on growth, photosynthesis, leaf anatomy and volatile isoprenoids of a monoterpeno-emitting herbaceous species (*Solanum lycopersicum* L.) and an isoprene-emitting tree (*Platanus orientalis* L.). *Environmental and Experimental Botany* 130:122-132, <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.05.014>
- Arzate-Fernández A. M., J. L. Piña-Escutia, T. H. Norman-Mondragón, J. I. Reyes-Díaz, K. L. Guevara-Suárez y L. M. Vázquez-García (2016) Regeneración de agave mezcalero (*Agave angustifolia* HAW.) a partir de embriones somáticos encapsulados. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39:359-366, <https://doi.org/10.35196/rfm.2016.4.359-366>
- Bautista-Castellanos A. I., J. R. Enríquez-del Valle, V. A. Velasco-Velasco y G. Rodríguez-Ortiz (2020) Enraizado y aclimatación de *Agave potatorum*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 7:e2618, <https://doi.org/10.19136/era.a7n3.2618>
- Benavides T., A. Córdova e I. Vaca (2016) Propagación *in vitro* de *Geranium chilloense* Willd. ex Kunth para la obtención de plantas completas. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida* 24:150-158. <https://doi.org/10.17163/lgr.n24.2016.12>
- Cruz C. E., M. Sandoval V., V. Volke H., V. Ordaz C., J. L. Tirado T. y J. Sánchez E. (2010) Generación de mezclas de sustratos mediante un programa de optimización utilizando variables físicas y químicas. *Terra Latinoamericana* 28:219-229.
- Cruz G. H., G. V. Campos Á., J. R. Enríquez V., V. A. Velasco V. y G. Rodríguez O. (2017) Senescencia foliar en plantas micropropagadas de *Agave americana* durante su aclimatación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8:381-391, <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i2.58>
- Cruz G. H., G. V. Campos Á., J. R. Enríquez V., G. Rodríguez O. y V. A. Velasco V. (2019) Desarrollo de plantas micropropagadas de *Agave americana* var. *oaxacensis* durante su aclimatación en invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10:1491-1503, <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1625>
- Da Silva J. A., D. D. T. Giang and M. Tanaka (2005) *In vitro* acclimatization of banana and *Cymbidium*. *International Journal of Botany* 1:41-49, <https://doi.org/10.3923/ijb.2005.41.49>
- Enríquez V. J. R. (2008) La Propagación y Crecimiento de Agaves. Fundación Produce Oaxaca AC-Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Oaxaca, México. 46 p.
- Enríquez V. J. R., G. Carrillo y J. L. Rodríguez O. (2005) Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28:175-178, <https://doi.org/10.35196/rfm.2005.2.175>
- Enríquez V. J. R., G. Rodríguez-Ortiz, J. Ruiz L., A. J. Pacheco R. y L. Vázquez V. (2018) Crecimiento y condición nutrimental de plantas micropropagadas de *Agave angustifolia* abonadas y

- fertirrigadas en vivero. *Revista Mexicana de Agroecosistemas* 5:106-115.
- Enríquez-del Valle J. R., V. A. Velasco, G. V Campos Á., E. Hernández-Gallardo and M. N. Rodríguez-Mendoza (2009) *Agave angustifolia* plants grown with different fertigation doses and organic substrates. *Acta Horticulturae* 843:49-56, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.843.4>
- Enríquez-del Valle J. R., K. H. Antonio-Luis, G. Rodríguez-Ortiz and G. V. Campos-Ángeles (2016) Effect of culture medium and incubation on the characteristics of micropropagated agave plants. *Ciencia e Investigación Agraria* 43:263-272, <https://doi.org/10.4067/S0718-16202016000200009>
- Enríquez-del Valle J. R., G. Rodríguez-Ortiz, V. A. Velasco-Velasco y E. López-Hernández (2021) Fertilización durante la aclimatación en invernadero de plantas de *Agave potatorum* micropropagadas. *Revista Mexicana de Agroecosistemas* 8:36-45.
- Ferreira L. S., A. L. Generoso, V. S. Carvalho, F. A. M. A. Figueiredo, R. Walter, T. M. Ferraz, .... and E. Camprostrini (2021) Better light spectral quality and thermal amplitude inside the greenhouse stimulate growth and improve acclimatization of *in vitro*-grown *Cattleya warneri* T. Moore. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 57:883-896, <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10162-8>
- Garnica-García R., J. R. Enríquez-del-Valle, G. Rodríguez-Ortiz, I. Pérez-León, R. Trejo-Calzada and I. Morales (2020) Plant growth and rhizome shoots of *Agave angustifolia* in different substrates, with fertigation and benzylaminopurine. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 32:702-710, <https://doi.org/10.9755/ejfa.2020.v32.i10.2141>
- Garriga C. M., G. González O., S. Alemán G., E. Abreu C., K. Quiroz B., P. D. S. Caligari and R. García-González (2010) Management of auxin-cytokinin interactions to improve micropropagation protocol of henequen (*Agave fourcroydes* Lem.). *Chilean Journal of Agricultural Research* 70:545-551, <https://doi.org/10.4067/S0718-58392010000400003>
- Jarquín-Rosales D., J. R. Enríquez-del Valle, J. J. Alpuche-Osorno, G. Rodríguez-Ortiz, M. P. Martín and G. V. Campos-Ángeles (2022) The effects of fertirrigation and *Azospirillum brasilense* inoculation on photosynthetic compounds of *Agave angustifolia*. *Australian Journal of Crop Science* 16:162-168, <https://doi.org/10.21475/ajcs.22.16.01.p3280>
- Lazcano-Bello M. I., E. Sandoval-Castro, M. A. Tornero-Campante, B. N. Hernández-Hernández, I. Ocampo-Fletes y R. Díaz-Ruiz (2021) Evaluación de sustratos, solución nutritiva y enraizador en producción de plántulas de jitomate. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 12:61-76, <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i1.2450>
- Manokari M. and M. S. Shekhawat (2017) Comprehensive analysis of *in vitro* to field transition of micromorphology and leaf architecture in *Passiflora edulis* Sims. *F. flavicarpa* Deg. *Indian Journal of Plant Physiology* 22:240-246, <https://doi.org/10.1007/s40502-017-0290-3>
- Martins J. P. R., E. R. Schimildt, R. S. Alexandre, A. R. Falqueto and W. C. Otoni (2015) Chlorophyll a fluorescence and growth of *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae) during acclimatization in response to light levels. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 51:471-481, <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9711-z>
- Miguel L. M. E., J. R. Enríquez-del Valle, V. A. Velasco V., Y. Villegas A., J. C. Carrillo R. y G. Rodríguez O. (2013) Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de *Agave*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* Esp. 6:1151-1159, <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i6.1279>
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nikam T. D., G. M. Bansude and K. C. A. Kumar (2003) Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). *Plant Cell Reports* 22:188-194, <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0675-9>
- Núñez A. (2009) Turba y zeolita como soporte de inoculantes microbianos con acción fertilizante. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar* 43:22-27.
- Pérez F. A. R., M. Ruiz M., M. O. Lobato C., E. Pérez V. y P. Rodríguez S. (2017) Sustratos biofísicos para agricultura protegida y urbana a partir de compost y agregados provenientes de los residuos sólidos urbanos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 34:383-394, <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.03.02>
- Portillo L. y F. Santacruz-Ruvalcaba (2006) Factibilidad de uso de un nuevo sistema de inmersión temporal (Orbitabion®) para embriogénesis somática de *Agave tequilana* Weber cultivar Azul. *Boletín. Nakari* 17:43-48.
- Pospišilová J., H. Synková, D. Haisel and S. Semorádová (2007) Acclimation of plantlets to *ex vitro* conditions: effects of air humidity, irradiance, CO<sub>2</sub> concentration and abscisic acid (a review). *Acta Horticulturae* 748:29-38, <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.748.2>
- Rescalvo-Morales A., K. Monja-Mio, M. L. Robert and L. F. Sánchez-Teyer (2019) Telomere length in *Agave tequilana* Weber plants during the *in vitro* to *ex vitro* transition. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 136:133-140, <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1499-1>
- Sánchez A., Z. Coronel-Lara, A. Gutiérrez, G. Vargas, M. L. Coronado y M. Esqueda (2020) Aclimatación y trasplante de vitroplantas de *Agave angustifolia* Haw. en condiciones silvestres. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11:1593-1605, <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i7.2403>
- SAS Institute (2004) Statistical Analysis System (SAS) User's Guide. SAS/ETS® 9.1. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, USA.
- Schmidt O., A. Torres N., E. R. Schimildt, V. S. Carvalho, W. C. Otoni and E. Camprostrini (2015) Photosynthetic capacity, growth and water relations in 'Golden' papaya cultivated *in vitro* with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 27:7-18, <https://doi.org/10.1007/s40626-014-0026-y>
- Silva B. D., S. H. S. Felipe, T. D. Silva, K. M. de Castro, T. C. Mamedes-Rodrigues, N. A. Miranda, ... and W. Campos O. (2018) Light quality in plant tissue culture: does it matter? *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 54:195-215, <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9902-5>
- Steiner A. A. (1984) The universal nutrient solution. Sixth International Congress on Soilless Culture. Wageningen, The Netherlands. pp:633-650.
- Valenzuela-Sánchez K. K., R. E. Juárez-Hernández, A. Cruz-Hernández, V. Olalde-Portugal, M. E. Valverde and O. Paredes-López (2006) Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 42:336-340, <https://doi.org/10.1079/IVP2006788>
- Wang J., W. Lu, Y. Tong and Q. Yang (2016) Leaf morphology, photosynthetic performance, chlorophyll fluorescence, stomatal development of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to different ratios of red light to blue light. *Frontiers in Plant Science* 7:250, <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00250>
- Xiao Y., G. Niu and T. Kozai (2011) Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 105:149-158, <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9863-9>