

Senescencia foliar en plantas micropropagadas de *Agave americana* durante su aclimatización*

Leaf senescence in micropropagated plants of *Agave americana* during acclimation

Hermila Cruz García¹, Gisela Virginia Campos Ángeles^{2§}, José Raymundo Enríquez del Valle², Vicente Arturo Velasco Velasco² y Gerardo Rodríguez Ortiz²

¹Posgrado en Ciencias en Productividad de Agroecosistemas-Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Ex hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca. CP. 71230. Tel. (01) 951 5170444. ²Posgrado e Investigación-Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca (ITVO). Ex hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca. CP. 71230. Tel. (01) 951 5170444. [§]Autor para correspondencia: (giscampos@gmail.com).

Resumen

En el estado de Oaxaca, *Agave americana* var. *oaxacensis* es una de las especies agaváceas de recolección silvestre que son utilizadas para la elaboración artesanal de mezcal. Existe poca información sobre su propagación y cultivo, recientemente se ha incrementado la propagación de agaves, mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales, con fines de conservación. Sin embargo, hay poca información sobre los cambios morfológicos y funcionales que realizan las plantas cuando son transferidas al ambiente *ex vitro*, entre ellos se encuentra la senescencia o pérdida gradual de las hojas formadas en el ambiente *in vitro*, en donde hay manipulación de las condiciones para controlar ciertos factores físicos y biológicos. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el comportamiento foliar de plantas micropropagadas de *Agave americana* var. *oaxacensis* como respuesta a diferentes sustratos y dosis de fertilización durante su aclimatización. Los resultados mostraron que el sustrato y la dosis de fertilización influyeron en la senescencia o pérdida de las hojas. La conservación de las hojas formadas *in vitro* por más tiempo, influyó en la formación de hojas nuevas en condiciones *ex vitro*. En general las plantas sustituyeron todas sus hojas formadas *in vitro* en un lapso de 240 días.

Abstract

In the state of Oaxaca, *Agave americana* var. *oaxacensis* is one of the agavaceous species of wild collection that are used for the artisan elaboration of mezcal. There is little information on its propagation and cultivation, recently the propagation of agaves has been increased, through the technique of plant tissue culture, for conservation purposes. However, there is little information on morphological and functional changes by plants when they are transferred to *ex vitro* environment, among them is senescence or gradual loss of leaves formed in the *in vitro* environment, where there is manipulation of conditions to control certain physical and biological factors. This study aimed to evaluate the foliar behavior of micropropagated plant *Agave americana* var. *oaxacensis* in response to different substrates and fertilization doses during their acclimatization. The results showed that the substrate and fertilization dose influenced leaf senescence or loss. The conserving leaves formed *in vitro* for longer, he influenced the formation of new leaves in *ex vitro* conditions. Generally, the plants replaced all its leaves formed *in vitro* in a span of 240 days.

Keywords: fertigation, growth, leaf blade, nutrients, substrates.

* Recibido: febrero de 2017
Aceptado: marzo de 2017

Palabras claves: crecimiento, fertirrigación, lámina foliar, nutrimentos, sustratos.

Introducción

En 2011, las plantas de agave representaron una fuente de ingreso para un total de 4 407 productores magueyeros de la “región del mezcal” que abarca siete distritos políticos (Antonio y Terán, 2008; Snidrus y Oeidrus 2011). Se utilizan alrededor de nueve especies de agave de las cuales *Agave angustifolia* (maguey espadín) es la de mayor demanda y la única que se cultiva de forma significativa (Cruz *et al.*, 2013), las ocho restantes son colectadas de poblaciones silvestres o semi-cultivadas principalmente en cercos vivos con poco o nulo manejo cultural. Tal es el caso del *Agave americana* var. *oaxacensis* conocido comúnmente como maguey “arroqueño”.

Los individuos de las poblaciones de esta especie están disminuyendo cada vez más, debido a diversos factores en los que se incluye su tasa de crecimiento muy lenta (tarda de 15 a 20 años en llegar a la madurez para cosecha); el cambio de uso de suelo y la dificultad para su reproducción ya que campesinos eliminan el escapo floral cuando éste inicia su crecimiento, para evitar que la planta consuma los azúcares acumulados en el tallo o piña; pero, con esto se evita la producción de semillas (Enríquez-del Valle, 2008; Ángeles, 2010).

Desde cualquier punto de vista es muy importante generar alternativas de reproducción. La mayoría de los agaves se pueden propagar mediante la germinación de semillas, vástagos de rizoma, bulbilos de la inflorescencia, y por métodos no convencionales como la micropropagación a través de la técnica de cultivo de tejidos vegetales, que es eficiente para lograr la multiplicación de una gran cantidad de plantas a partir de células y tejidos somáticos que se establecen en un medio de cultivo formado por carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, hormonas de crecimiento, sales inorgánicas tanto macronutrimentos como micronutrimentos, sustancias de soporte físico y agua (Hartman y Kester, 1994; Enríquez-del valle, 2008). El proceso de micropropagación consta de varias etapas: 1) establecimiento de cultivos asépticos; 2) multiplicación de propágulos; 3) enraizado de brotes; y 4) aclimatación de las plántulas (George y Debergh, 2008; Enríquez-del Valle, 2008). Esta última etapa citada es considerada crítica

Introduction

In 2011, agave plants represented a source of income for a total of 4 407 magueyeros producers in the “mezcal region”, which covers seven political districts (Antonio and Teran, 2008; Snidrus and Oeidrus 2011). About nine species of agave of which *Agave angustifolia* (sprat maguey) is the most in demand and the only grown significantly used (Cruz *et al.*, 2013), the remaining eight are collected from wild or semi-cultivated mainly in living fences with little or no cultural management. Such is the case of *Agave americana* var. *oaxacensis* commonly known as maguey “arroqueño”.

The individuals in this species population are declining more and more due to various factors including their very slow growth rate (it takes 15 to 20 years to reach maturity for harvest); the change of soil use and the difficulty of its reproduction, since peasants eliminate the floral scape when it begins its growth, to avoid that the plant consumes the accumulated sugars in the stem or pineapple; but, this prevents seed production (Enríquez-del Valle, 2008; Ángeles, 2010).

From any point of view, it is very important to generate alternatives of reproduction. Most agaves can be propagated by germination of seeds, rhizome stems, inflorescence bulbils, and by non-conventional methods such as micropropagation through the plant tissue culture technique, which is efficient to achieve multiplication of a large number of plants from somatic cells and tissues that are established in a culture medium consisting of carbohydrates, vitamins, aminoacids, growth hormones, inorganic salts, both macronutrients and micronutrients, physical substances and water (Hartman and Kester, 1994; Enríquez-del Valle, 2008). The micropropagation process consists of several stages: 1) establishment of aseptic crops; 2) propagation multiplication; 3) rooted shoots; and 4) acclimatization of seedlings (George and Debergh, 2008, Enríquez-del Valle, 2008). This last mentioned stage is considered critical for the majority of the species; And in the case of micropropagated agave plants, high percentages of survival have been reported. Abreu *et al.* (2007) report 90% survival in *A. fourcroydes*; Enríquez-del Valle and Cruz-Valdez (2012) 100% for *Agave angustifolia* Haw.

In order to obtain good quality plants, special attention has been given to the type of substrate and the availability of nutrients required by the plants during their acclimatization

para la mayoría de las especies; y en el caso de plantas de agave micropropagadas, se han reportado altos porcentajes de sobrevivencia. Abreu *et al.* (2007), reportan 90% de sobrevivencia en *A. fourcroydes*; Enríquez-del Valle y Cruz-Valdez, (2012) 100% para *Agave angustifolia* Haw.

Con el objetivo de obtener plantas de buena calidad se ha puesto especial interés al tipo de sustrato y disponibilidad de nutrientes que requieren las plantas durante su proceso de aclimatización, durante el cual deben asumir cambios en sus características morfológicas y fisiológicas que les permitan continuar con su crecimiento y desarrollo al momento de establecerlas en campo, en donde las condiciones ambientales son poco favorables (Enríquez-del Valle *et al.*, 2009). Entre los cambios morfológicos ocurridos durante el proceso de aclimatización se encuentra el reemplazamiento de las hojas formadas en el ambiente *in vitro*, por hojas nuevas (Zimmerman, 1991; Pospisilova, *et al.*, 1999), debido a que las hojas formadas en el ambiente *in vitro* presentan deficiencias morfológicas y fisiológicas, entre ellas se menciona que son muy frágiles, delgadas, estomas poco funcionales, cutícula muy delgada y poco desarrollada, elevada tasa de transpiración, baja tasa fotosintética (Pierik, 1990; Zimmerman, 1991).

Sin embargo, la información que existe sobre este proceso de reemplazo de las hojas formadas *in vitro*, así como los factores que influyen durante el proceso de aclimatización de las plantas micropropagadas es escaso. Debido a que la respuesta o aclimatización de las plantas depende del manejo que se le proporcione, en este estudio se evaluó el efecto del tipo de sustrato y la dosis de fertilización, sobre el comportamiento foliar que ocurre en las plantas micropropagadas de *Agave americana* var. *oaxacensis* durante su aclimatización.

Materiales y métodos

La investigación se realizó durante el periodo de septiembre de 2011 a agosto de 2013, en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales e invernaderos del Instituto Tecnológico del Valle del Oaxaca, ubicado en Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca. Mediante la micropropagación, a partir de brotes de tejido de tallo, que fueron sometidos a procesos de multiplicación y su posterior enraizado, se obtuvieron plantas de *Agave americana* var. *oaxacensis*, las cuales tenían en promedio 6.75 hojas, 5 raíces, 9.78 cm de longitud de la hoja más

process, during which they must assume changes in their morphological and physiological characteristics that allow them to continue their growth and development when setting them in the field, where environmental conditions are unfavorable (Enríquez-del Valle *et al.*, 2009). Among the morphological changes during the acclimation process is the replacement of the leaves formed in the *in vitro* environment, by new leaves (Zimmerman, 1991; Pospisilova *et al.*, 1999), because the sheets formed in the *in vitro* environment have morphological and physiological deficiencies, including mentioned that are very fragile, thin, stomata little functional, cuticle very thin and poorly developed, high transpiration rate, low photosynthetic rate (Pierik, 1990; Zimmerman, 1991).

However, the information that exists on this process of replacement of sheets formed *in vitro*, as well as the factors influencing during acclimatization of micropropagated plants, is scarce. Because the response or acclimatization of plants depends on the management to be provided, in this study was evaluated the effect of substrate type and dose of fertilization on foliar behavior occurring in micropropagated plants *Agave americana* var. *oaxacensis* during its acclimatization.

Materials and methods

The research was carried out during the period from September 2011 To August 2013, in the plant tissue culture and greenhouse laboratory of the Technological Institute of the Valley of Oaxaca, located in Nazareno, Xoxocotlan, Oaxaca. By micropropagation, buds from stem tissue, which were subjected to processes of multiplication and rooting later, plants were obtained *Agave americana* var. *Oaxacensis*, which had on average 6.75 leaves, 5 roots, 9.78 cm of longest leaf length with 0.64 cm wide. It were transplanted to polyethylene pots with a capacity of 171 cm³, the substrates were produced with peat and sand in different proportions (1:2, 2:1, 3:1) in relation to its volume.

The acclimatization of the plants was carried out in a greenhouse with solar radiation reduced to 50%, temperature from 24 to 28 °C, high relative humidity 80-90% and received once a week 10 mL of the Universal Steiner Solution (1984) a 10% of nutrient concentration, under these conditions were maintained for 45 days, later they were transferred to a second greenhouse with higher solar radiation, temperature

larga con 0.64 cm de ancho. Se trasplantaron a macetas de polietileno con capacidad de 171 cm³, los sustratos se elaboraron con turba y arena en diferente proporción (1:2, 2:1, 3:1) en relación con su volumen.

La aclimatización de las plantas se realizó en un invernadero con radiación solar disminuida a 50%, temperatura de 24 a 28 °C, humedad relativa alta 80-90% y recibieron una vez por semana 10 mL de la Solución Universal Steiner (1984) a 10% de concentración de nutrimentos, en estas condiciones se mantuvieron durante 45 días, posteriormente se trasladaron a un segundo invernadero con mayor radiación solar, temperatura de 20 a 38 °C, humedad relativa baja y la aportación de la solución Steiner a nivel de sustrato, se aplicó tres veces por semana de acuerdo a los tratamientos establecidos, hasta finalizar el experimento.

Durante el desarrollo del experimento se le dio seguimiento a las hojas formadas en condición *in vitro* y a las hojas formadas en condición *ex vitro*. Para diferenciarlas se marcaron con hilo cáñamo de color rojo y amarillo. Se registraron datos de crecimiento en longitud y ancho de las hojas, cada 30 días a partir del inicio de la aclimatización de las plantas en invernadero. Otras de las variables evaluadas fueron el recambio de hojas, es decir, número de hojas formadas en condición *in vitro* y número de hojas senescentes o perdidas formadas en condición *in vitro*.

Los datos registrados para cada variable de estudio, se sometieron a un análisis de varianza. Se realizó la comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia al 95% ($\alpha = 0.05$) mediante el paquete estadístico SAS (The SAS System for Windows 9.0). Con los datos obtenidos se elaboraron cuadros, gráficas y figuras.

Resultados y discusión

Senescencia o pérdida gradual de hojas formadas en ambiente *in vitro*

Durante el proceso de aclimatización, las plantas pasan de un ambiente de baja transpiración a otro que exige una mayor demanda hídrica. Sin embargo, en las plantas cultivadas *in vitro* la raíz tiene escasa conexión con el tallo y son muy frágiles, lo que según Fila *et al.* (1998); Hazarika, (2006) ocasiona que al establecerlas en los sustratos se rompan, por

of 20 to 38 °C, low relative humidity and the contribution of the Steiner solution at the substrate level, was applied three times per week according to established treatments, until the end of the experiment.

During the course of the experiment will be followed up sheets formed in condition *in vitro* and *ex vitro* leaves formed in condition. To differentiate them were marked with hemp yarn red and yellow. Growth data on leaf length and width were recorded every 30 days from the beginning of the acclimatization of the greenhouse plants. Other variables evaluated were the replacement of sheets, i.e. sheets formed in number of *in vitro* condition and number of senescent leaves or lost formed in *in vitro* condition.

The data recorded for each study variable were subjected to an analysis of variance. Tukey's mean comparison was performed with a level of significance at 95% ($\alpha = 0.05$) using the SAS statistical package (The SAS System for Windows 9.0). With the data obtained tables, graphs and figures were elaborated.

Results and discussion

Senescence or gradual loss of leaves formed *in vitro* environment

During the acclimatization process, the plants move from a low-sweeping environment to one that demands increased water demand. However, in plants grown *in vitro* the root it has little connection to the stem and are very fragile, which according Fila *et al.* (1998); Hazarika (2006) causes that when establishing them in the substrates are broken, therefore it prevents the efficient transport of water and nutrients. The low assimilation of water and nutrients, coupled with the morphology of leaves that are very thin, little development of the cuticle and little or no accumulation of waxes, influence their behavior during their acclimatization. Pospíšilová *et al.* (1999), mention that the sheets forming the *in vitro* plant condition, are unable to continue their development when are transferred to *ex vitro* environment. Fuentes *et al.* (2005) mention that the leaves produced *in vitro* storing structures act as nutrients, supporting the growth of new leaves developed *ex vitro*. Quesada and Valpuesta (2004) indicate that senescence and subsequent leaf loss is not only a degenerative process but also a recycling process in which nutrients are transported from aging cells to young leaves.

lo tanto se impide el transporte eficiente de agua y nutrientes. La baja asimilación de agua y de nutrientes, aunada a la morfología de las hojas que son muy delgadas, escaso desarrollo de la cutícula y poca o nula acumulación de ceras, influyen en su comportamiento durante su aclimatización. Pospíšilová *et al.* (1999), mencionan que las hojas que forma la planta en condición *in vitro*, no son capaces de continuar su desarrollo cuando se transfieren al ambiente *ex vitro*. Fuentes *et al.* (2005), mencionan que las hojas producidas *in vitro* actúan como estructuras almacenadoras de nutrientes, que sostienen el crecimiento de las nuevas hojas desarrolladas *ex vitro*. Quesada y Valpuesta (2004), indican que la senescencia y posterior pérdida foliar no es sólo un proceso degenerativo, sino también un proceso de reciclaje en el que los nutrientes son transportados desde las células que envejecen a las hojas jóvenes.

Las plantas de *Agave americana* var. *oaxacensis* estudiadas mostraron cambios en su morfología cuando se expusieron a mayor radiación solar; esto ocurrió después de los 45 días de aclimatización. Uno de los primeros síntomas que adquirieron las plantas como respuesta al inicio de la pérdida de sus hojas formadas *in vitro*, fue el cambio de color verde a púrpura (Figura 1). Esta coloración se presentó en primer lugar en las hojas inferiores de mayor edad, manifestándose en la parte distal y posteriormente expandiéndose por toda la lámina foliar. El color púrpura de las hojas se debió a la presencia de antocianinas. La acumulación de antocianinas en las hojas puede deberse a múltiples factores de estrés, entre los que se destaca la alta irradiación y la deficiencia de nutrientes (Peng *et al.*, 2008). En hojas senescentes, donde la movilización de nutrientes hacia otros órganos se incrementa, la acumulación de antocianinas permitiría minimizar el potencial por daño foto-oxidativo (Hoct *et al.*, 2003).

Dentro de los cambios más importantes a los que tienen que adaptarse las plantas producidas *in vitro*, es al aumento gradual de la intensidad luminosa. Una vez que las plantas micropropagadas son transferidas al ambiente *ex vitro*, estas resultan altamente susceptibles a la fotoinhibición (Osorio *et al.*, 2010).

La pérdida de las hojas formadas en condición *in vitro* fue gradual, siendo las inferiores de mayor edad las que murieron primero. En general las plantas sustituyeron todas sus hojas formadas *in vitro* en un lapso de 240 días. Esto coincide con lo mencionado por Pyung *et al.* (2007), quienes mencionan que la degeneración de las células en el tejido

The plants *Agave americana* var. *oaxacensis* studied showed changes in their morphology when exposed to higher solar radiation; this occurred after 45 days of acclimatization. One of the first signs that acquired plants in response to the onset of the loss of their leaves formed *in vitro*, was the change from green to purple (Figure 1). This coloration was first presented in the lower leaves of older age, manifesting in the distal part and later expanding throughout the leaf blade. The purple color of the leaves was due to the presence of anthocyanins. The accumulation of anthocyanins in the leaves may be due to multiple stressors, stands out the high irradiation and nutrient deficiency (Peng *et al.*, 2008). In senescent leaves where nutrient mobilization to other organs increases, anthocyanin accumulation would minimize the potential for photo-oxidative damage (Hoct *et al.*, 2003).



Figura 1. Cambios en la morfología de las plantas de *A. americana* var. *oaxacensis*, por la pérdida y formación de hojas nuevas durante su aclimatización en invernadero.

Figure 1. Changes in the morphology of plants *A. americana* var. *oaxacensis*, for the loss and formation of new leaves during their acclimatization in greenhouse.

Among the most important changes that have to adapt plants produced *in vitro*, is the gradual increase in light intensity. Once micropropagated plants are transferred to *ex vitro* environment, these are highly susceptible to photoinhibition (Osorio *et al.*, 2010).

es lenta, debido a que la planta asegurará la translocación de las macromoléculas hacia los sitios de demanda como formación de hojas nuevas, frutos o yemas de crecimiento. También podría ser por el tipo de especie, ya que los agaves presentan tasas de crecimiento bajas, además sus hojas son duras, carnosas, fibrosas etc, lo cual hace más lenta la degeneración de sus tejidos, así como también la capacidad de renovación de los mismos.

En este estudio, el tiempo que tardaron las plantas en perder sus hojas fue diferente. Las plantas que se establecieron en el sustrato que tenía una porción de turba combinado con dos de arena y que además recibieron fertilización diferente, perdieron más rápido sus hojas en un tiempo de 180 días, en comparación con las plantas que se establecieron en el sustrato con dos y tres porciones de turba combinados con una de arena y que además recibieron fertilización, las cuales perdieron sus hojas formadas en condición *in vitro*, en un tiempo de 240 días. A los 90 días, las plantas establecidas en el sustrato con una porción de turba combinado con dos de arena y que además recibieron fertilización diferente, habían perdido el 50% de sus hojas totales, en cambio las plantas establecidas en los sustratos con dos y tres porciones de turba y que además recibieron fertilización diferente, habían perdido 30.2 y 33.15% del total de sus hojas formadas en condición *ex vitro*, respectivamente (Cuadro 1).

Por otra parte, al duplicarse el tiempo de aclimatación es decir, a los 180 días se observó la pérdida de 100% de las hojas formadas *in vitro* en las plantas que se establecieron en el sustrato con una porción de turba combinado con dos de arena y que además recibieron fertilización diferente. En cambio, para las plantas establecidas en los sustratos con dos y tres porciones de turba y que además recibieron fertilización diferente, habían perdido en promedio 0.46 y 68.8% del total de sus hojas formadas *in vitro* respectivamente.

De acuerdo con el análisis de varianza, el factor sustrato tuvo efectos significativos ($p \leq 0.01$) sobre el descenso o pérdida de hojas formadas *in vitro*, durante su aclimatación a los 90, 120, 150, 180 y 210 días. En cambio el factor fertilización no influyó en la pérdida de las hojas formadas *in vitro* durante los días evaluados, ni la interacción sustrato-fertilización.

Los análisis de comparación de medias mostraron que hubo diferencia significativa sobre el número de hojas perdidas por las plantas establecidas en los diferentes tratamientos. A 90 días de aclimatación las plantas que habían perdido mayor de 3.2 hojas en promedio, fueron las que se

The loss of leaves formed *in vitro* condition was gradual, with the lower older than died first. Generally plants replaced all its leaves formed *in vitro* in a span of 240 days. This refractivity as mentioned by Pyung *et al.* (2007), who mention that the degeneration of cells in the tissue is slow, because the plant will ensure the translocation of the macromolecules to the sites of demand such as formation of new leaves, fruits or growth buds. It could also be due to the type of species, since the agaves have low growth rates, in addition their leaves are hard, fleshy, fibrous etc., which slows the degeneration of their tissues, as well as the capacity of renewal of the same.

In this study, the time it took the plants to lose their leaves was different. The plants that settled on the substrate that had a portion of peat combined with two of sand and that also received different fertilization, lost their leaves faster in a time of 180 days, compared to the plants that settled in the substrate with two to three servings of peat combined with sand and also received fertilizer, which lost their leaves formed in *in vitro* condition, in a time of 240 days. At 90 days, the plants established in the substrate with a portion of peat combined with two of sand and that also received different fertilization, had lost 50% of their total leaves, whereas the plants established in the substrates with two and three portions of peat and also received different fertilization, had lost 30.2 and 33.15% of its leaves formed in *ex vitro* condition, respectively (Table 1).

Furthermore, the doubling time of acclimatization i.e. to the 180 days was observed the loss of 100% of the sheets formed *in vitro* plants were established in the substrate with a portion of combined peat with two sand and which also received different fertilization. But for established plants in substrates with two and three parts peat and also received different fertilization, had lost an average of 0.46 and 68.8% of its leaves formed *in vitro* respectively.

According to the analysis of variance, the substrate factor had significant effects ($p \leq 0.01$) on the decrease or loss of leaves formed *in vitro* during acclimatization at 90, 120, 150, 180 and 210 days. Instead the fertilization factor did not influence the loss of leaves formed *in vitro* during the days tested, or interaction substrate-fertilization.

The mean comparison analyzes showed that there was a significant difference in the number of leaves lost by the plants established in the different treatments. At 90 days of acclimatization, the plants that had lost the largest average amount of 3.2 leaves were those that settled on

establecieron en los sustratos con una porción de turba combinado con dos de arena y que recibieron fertilización diferente, mientras que las plantas que se establecieron en los sustratos con dos y tres porciones de turba, habían perdido un promedio de 1.8 hojas. Este comportamiento fue similar a los demás días evaluados durante la aclimatización. Los sustratos en los que las plantas perdieron más rápido sus hojas formadas *in vitro*, fueron los compuestos por una porción de turba combinado con dos de arena y que además recibieron fertilización diferente (Cuadro 1).

the substrates with a portion of peat combined with two of sand and that received different fertilization, while the plants that were established on substrates with two and three portions of peat, had lost an average of 1.8 leaves. This behavior of leaf loss in plants according to treatments was similar to the other days evaluated during acclimatization. The substrates in which the plants lost faster leaves formed *in vitro*, were compounds by a portion of peat combined with two sand and also received different fertilization (Table 1).

Cuadro 1. Efecto del sustrato y fertilización sobre la senescencia de hojas de *A. americana* durante su aclimatización en invernadero.

Table 1. Effect of substrate and fertilization on leaf senescence of *A. americana* during acclimatization greenhouse.

Sustrato	Fertilización (%)	Días de aclimatación					
		90	120	150	180	210	240
1T:2A	0	3.1 a	4.3 a	5 ab	6.1 ab	6.1 abc	6.1 a
	50	3.4 a	4 ab	5.4 a	6.7 a	6.7 a	6.7 a
	100	3.1 a	3.9 ab	5.1 a	6.4 a	6.4 ab	6.4 a
2T:1A	0	1.7 b	2.4 c	2.9 c	3.7 c	4.9 bc	5.7 a
	50	2 b	2.7 bc	3.3 c	4.3 c	5.1 abc	6.1 a
	100	1.9 b	3 abc	3.6 bc	4.6 bc	5.3 abc	6.1 a
3T:1A	0	1.9 b	2.7 bc	3.3 c	3.9 c	5 bc	6.1 a
	50	1.9 b	2.6 bc	3.4 c	4 c	4.6 c	5.4 a
	100	1.9 b	2.7 bc	3.4 c	4.1 c	4.7 c	5.7 a
Sustrato		***	***	***	***	***	ns
Fertilización		ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sust*Fert		ns	ns	ns	ns	ns	ns

T= turba; A= arena; ***= valor de F altamente significativo ($p \leq 0.01$); ns= valor de F no significativo ($p \geq 0.05$). Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Las plantas que se establecieron en los sustratos con dos y tres porciones de turba combinado con dos de arena y que se les aplicó fertilización diferente, se vieron favorecidas ya que el total de sus hojas que habían formado durante su cultivo *in vitro* las sustituyeron por hojas nuevas, 60 días después en comparación con las plantas establecidas en los sustratos con una porción de turba combinado con dos de arena.

The plants were established on substrates with two and three servings of combined peat with two sand and we applied different fertilization, were favored as the total of their leaves that had formed during culture *in vitro* replaced by leaves new, 60 days later compared to plants established on substrates with a portion of peat combined with two of sand.

Lo anterior denota que la senescencia y posterior pérdida de las hojas formadas *in vitro* fue más lento en las plantas que se establecieron en un sustrato con mayor proporción de turba combinado con arena. La permanencia de las hojas formadas *in vitro* por más tiempo favoreció la generación de hojas nuevas en la planta.

This indicates that senescence and subsequent loss of leaves formed *in vitro* was slower in plants that were established in a substrate with a higher proportion of peat combined with sand. The permanence of the sheets formed *in vitro* longer favored the generation of new leaves in the plant.

Formación de hojas nuevas en ambiente *ex vitro*

Durante la aclimatación, las plantas micropropagadas generan hojas nuevas con características similares a las plantas que crecen en un ambiente natural. En el caso de las plantas de *Agave americana* var. *oaxacensis*, se observó que las primeras hojas que se generaron *ex vitro*, presentaron una capa ligera de ceras, lo cual les dio una tonalidad grisácea; además comenzaron a adquirir dureza. Sin embargo, estas hojas aún no habían adquirido las características de una planta que crece en condiciones ambientales naturales. En esta investigación, se observó que a partir de la segunda o tercer hoja nueva que se formó *ex vitro*, presentaron una capa más densa de ceras, carnosas, rígidas, duras y presencia de espinas en los bordes de las hojas (Figura 2), lo cual difiere de las primeras hojas que generaron las plantas.

Lo anterior denota que el cambio es gradual y conforme avanzan los días de aclimatación, la planta presenta cambios en sus hojas como respuesta al proceso de adaptación. Los agaves poseen características morfológicas, anatómicas y fisiológicas como el desarrollo de succulencia o engrosamiento en hojas, cutícula gruesa y el depósito de distintas capas de ceras sobre la superficie epidérmica y metabolismo CAM, que les han permitido crecer y desarrollarse en ambientes poco favorables (García-Mendoza, 2007).

El crecimiento y desarrollo de las hojas va a depender del tipo de sustrato y disponibilidad de nutrientes. En base a los análisis de varianza, el factor sustrato tuvo efectos significativos ($p \leq 0.01$) sobre el número de hojas nuevas formadas a los 90, 120, 150, 180, 210 y 240 días de aclimatación. Mientras que el factor fertilización mostró significancia estadística en su efecto sobre la característica mencionada, a partir del día 180 hasta los 240 días de aclimatación. En cambio, la interacción sustrato-fertilización mostraron efectos significativos sobre el número de hojas nuevas formadas a los 150, 180 y 240 días de aclimatación (Cuadro 2).

Los análisis de comparación de medias mostraron que hubo diferencia significativa sobre el número de hojas nuevas generadas en las plantas establecidas en los diferentes tratamientos. A 90 días de aclimatación las plantas establecidas en los diferentes tratamientos habían generado la misma cantidad de hojas en promedio (2.18). Sin embargo, a 180 días la diferencia entre las plantas fue notoria. Las que se establecieron en sustrato con dos porciones de turba combinado con dos de arena y además con fertilización

Formation of new leaves in *ex vitro* environment

During acclimatization, micropropagated plants generate new leaves with characteristics similar to plants growing in a natural environment. In the case of plants *Agave americana* var. *oaxacensis*, it was observed that the first leaves that were generated *ex vitro*, showed a light coat of wax, which gave them a grayish hue; also began to acquire hardness. However, these leaves had not yet acquired the characteristics of a plant growing under natural environmental conditions. In this research, it was observed that from the second or third new sheet that formed *ex vitro*, showed a layer denser waxes, fleshy, rigid, hard and presence of spines on the edges of the leaves (Figure 2), which differs from the first leaves that the plants generated.

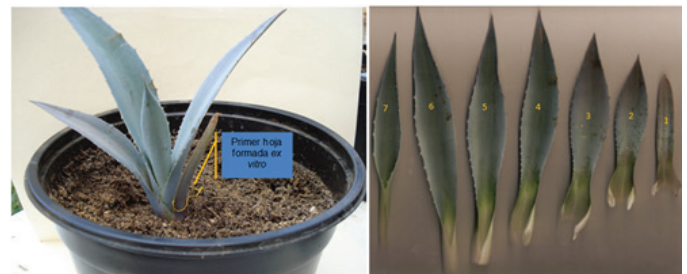


Figura 2. Morfología de hojas nuevas de plantas de *A. americana* generadas durante su aclimatación en invernadero.

Figure 2. Morphology of new *A. americana* plants generated during acclimatization in greenhouse leaves.

This indicates that the change is gradual and as the days of acclimatization advance, the plant presents changes in its leaves in response to the adaptation process. The agaves have morphological, anatomical and physiological characteristics such as the development of succulence or thickening in leaves, thick cuticle and deposit of different layers of waxes on the epidermal surface and CAM metabolism, which have allowed them to grow and develop in unfavorable environments (García-Mendoza, 2007).

The growth and development of the leaves will depend on the type of substrate and availability of nutrients. Based on the analysis of variance, the substrate factor had significant effects ($p \leq 0.01$) on the number of new leaves formed at 90, 120, 150, 180, 210 and 240 days of acclimatization. While the fertilization factor showed statistical significance in its effect on the mentioned characteristic, from the day 180 to

al 100% habían formado el mayor número de hojas (4.3), mientras que el menor número de hojas (3), lo presentaron las plantas establecidas en sustratos con una porción de turba combinado con dos de arena sin fertilización.

the 240 days of acclimatization. In contrast, the substrate-fertilization interaction showed significant effects on the number of new leaves formed at 150, 180 and 240 days of acclimatization (Table 2).

Cuadro 2. Efecto del sustrato y fertilización sobre la formación de hojas nuevas de *A. americana* durante su aclimatización en invernadero.

Table 2. Effect of substrate and fertilization on the formation of new leaves of *A. american* during acclimatization greenhouse.

Sustrato	Fertilización (%)	Días de aclimatización					
		90	120	150	180	210	240
1T:2A	0	2 a	2.3 b	3 abc	3 c	3.1 c	3.1 e
	50	2.1 a	2.4 ab	3 abc	3.6 bc	3.6 c	3.6 de
	100	2.1 a	2.6 ab	2.7 c	3.3 c	3.6 c	3.6 de
2T:1A	0	2.7 a	3.1 a	3.7 a	4.1 ab	4.7 ab	4.9 bc
	50	2.4 a	2.7 ab	3.3 abc	3.4 bc	3.9 bc	4.6 c
	100	2.6 a	3 ab	3.6 ab	4.3 a	5 a	6 a
3 T:1A	0	2.3 a	2.6 ab	2.9 bc	3.3 c	3.9 bc	4.3 cd
	50	2.3 a	2.9 ab	3 abc	3.7 abc	4.1 abc	4.6 c
	100	2.6 a	3 ab	3.6 ab	4.1 ab	4.7 ab	5.6 ab
Sustrato		**	***	***	***	***	***
Fertilización		ns	ns	ns	***	***	***
Sust*Fert		ns	ns	*	**	ns	**

T= turba; A= arena; ***= valor de F altamente significativo ($p \leq 0.01$); ns= valor de F, no significativo ($p \geq 0.05$). Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

A 240 días de aclimatización, las plantas establecidas en los sustratos con dos y tres porciones de turba combinado con poción una de arena y que además recibieron fertilización diferente, habían formado 32% más hojas respecto a las plantas establecidas en los sustratos con una porción de turba combinado con dos de arena y que recibieron fertilización diferente.

De manera general, se observó que las plantas generaron mayor cantidad de hojas cuando se aplicó a nivel de sustrato la solución nutritiva con 100% de concentración de nutrimentos. Lo que indica que el sustrato no alcanza a cubrir las necesidades nutrimentales y que cuando se adiciona solución nutritiva, las plantas mejoran su condición. Esto concuerda con Enríquez-del Valle *et al.*, (2012), quienes menciona que al finalizar la etapa de aclimatización de *A. angustifolia*, el nivel de desarrollo de las plantas y la acumulación de N, P y K se incrementaron en relación directa a la concentración de nutrimentos en la solución nutritiva, hasta el óptimo al 66 y 100%.

The mean comparison analyzes showed that there was a significant difference in the number of new leaves generated in the plants established in the different treatments. At 90 days of acclimatization the plants established in the different treatments had generated the same amount of leaves on average (2.18). However, at 180 days the difference between plants was more noticeable. Those that were established in the substrate with two portions of peat combined with two of sand and that also received 100% fertilization had formed the largest number of leaves (4.3), while the smaller number of leaves (3), the plants established in the substrates with a portion of peat combined with two of sand that did not receive fertilization.

At 240 days of acclimatization, the plants established in the substrates with two and three portions of peat combined with a portion of sand and that also received different fertilization, had formed 32% more leaves with respect to the plants established in the substrates with a portion of peat combined with two of sand and which received different fertilization.

Conclusiones

Las plantas micropropagadas sustituyen o reemplazan las hojas formadas *in vitro* como una estrategia de adaptación fisiológica para su crecimiento y desarrollo, ya que las hojas nuevas formadas en condiciones *ex vitro* adquieren características fenotípicas que caracterizan a la especie de agave. La disponibilidad de nutrientes determina el recambio de las hojas, en este caso el aporte de materia orgánica en mayor cantidad, mediante un sustrato como la turba y la fertilización adicional, favorece la relación entre pérdida y formación de hojas haciéndola gradual.

Literatura citada

- Abreu, E.; González, G.; Ortiz, R.; Rodríguez, P.; Domech, R. y Garriga, M. 2007. Evaluación de vitroplantas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) durante la fase de aclimatización. *Cultivos Tropicales*. 28(1):5-11.
- Ángeles, C. G. C. 2010. De la biodiversidad al monocultivo: efectos del monocultivo de *Agave angustifolia* en el estado de Oaxaca. *In: patrimonio natural y territorio*. Ávila, R. L. E. y Pardini, G. (Coords). 1. Valle de Jovel, Chiapas. 96-138 pp.
- Antonio, B. J. y Terán, M. E. 2008. Estrategias de producción y mercadotecnia del mezcal en Oaxaca. *In: El cotidiano revista de la realidad mexicana actual*. División de Ciencias Sociales y Humanidades. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Azcapotzalco. Marzo- abril. México, D. F. 128:113-121.
- Cruz, G. H.; Enríquez, del V. J. R.; Velasco, V. V. A.; Ruiz, L. J.; Campos, A. G. V. y Aquino, G. D. E. 2013. Nutrientes y carbohidratos en plantas de *Agave angustifolia* Haw y *Agave karwinskii* Zucc. *Revi. Mex. Cienc. Agríc.* 6:1161-1173.
- Enríquez, del V. J. R. 2008. La propagación y crecimiento de agaves. Fundación Produce Oaxaca, A. C. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Oaxaca. México. 46. p.
- Enríquez, V. J. R.; Velasco, V. V. A.; Campos, A. G. V.; Hernández, G. E. and Rodríguez, M. M. N. 2009. *Agave angustifolia* plants grown with different fertigation doses and organic substrates. *Acta Hortic.* 843:49-55.
- Enríquez, del V. J. R. y Cruz-Valdez, I. 2012. Acclimatization of *Agave angustifolia* Haw. vitroplants in inert substrates and fertirrigated with different nutrimental dose. *In: Proceedings of the Second International Symposium on Soilless Culture and Hydroponics*. Gómez-Merino, F. C.; Trejo-Téllez, L. I. y Rodríguez-Mendoza, M. N. (Eds). *Acta Hortic.* 947:101-104
- Fila, G.; Ghashghaie, J.; Hoarau, J. and Cornic, G. 1998. Photosynthesis leaf conductance and water relations of *in vitro* cultured grapevine rootstock in relation to acclimatization. *Physiol. Plant.* 102:411-418.
- Fuentes, G.; Talavera, C.; Oropeza, C.; Desjardins, Y. and Santamaria, J. 2005. Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut *in vitro* plantlets. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 41:69-76.

In general, it was observed that the plants generated more leaves when the nutrient solution with 100% concentration of nutrients was applied to them at the substrate level. This indicates that the substrate does not cover nutritional needs and that when a nutrient solution is added, the plants improve their condition. This is consistent with Enriquez-del Valle *et al.* (2012), who mentions that at the end of the stage of acclimatization of *A. angustifolia*, the level of plant growth and accumulation of N, P and K increased in direct relation to the concentration of nutrients in the nutrient solution, to the optimum at 66 and 100%.

Conclusions

The micropropagated plants supersede or replace the sheets formed *in vitro* as a physiological adaptation strategy for growth and development, as saying the new leaves formed in *ex vitro* conditions acquire phenotypic features that characterize the species of agave. The availability of nutrients determines the replacement of the leaves, in this case the contribution of organic matter in greater quantity, through a substrate such as peat and additional fertilization, favors the relationship between loss and formation of leaves making it gradual.

End of the English version



- García-Mendoza, A. 2007. Los agaves de México. *Ciencias*. (87):14-23.
- George, E. F. y Debergh, P. C. 2008. Micropropagation: uses and methods. *In: George, E. F.; Hall, M. and De Klerk, G. Plant propagation by tissue culture*. 3rd edition. The Background. Springer. 29-64 pp.
- Hazarika, B. N. 2006. Morpho-physiological disorders *in vitro* culture of plants. *Scientia Hortic.* 108:105-120.
- Hartmann, H. T. y Kester, D. E. 1994. Propagación de plantas. Principios y prácticas. 2^{da} edición. Editorial CECSA. México. 760 p.
- Hoch, W. A.; Singsaas, E. L. and Mc Cown, B. H. 2003. Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in Autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant Physiol.* 133:1296-1305.
- Osório, M.; Osório, J. and Romano, A. 2010. Chlorophyll fluorescence in micropropagated *Rhododendron ponticum* subsp. baeticum plants in response to different irradiances. *Biol. Plant.* 54(3):415-422.
- Peng, M.; Hudson, D.; Schofield, A.; Tsao, R.; Yang, R.; Gu, H.; Bi, Y. and Rothstein, S. J. 2008. Adaptation of arabidopsis to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the NLA gene. *J. Exp. Bot.* 59:2933-2944.
- Pierik, R. L. M. 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi Prensas. Madrid, España. 326 p.

- Pospíšilová, J.; Tichá, I.; Kadleček, P.; Haisel, D. and Plzáková, Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biol. Plantarum*. 42:481-497.
- Pyung, O. L.; Kim, H J and Nam, H. G. 2007. Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58:115-136.
- Quesada, M. A y Valpuesta, V. 2004. Juvenibilidad, senescencia y abscisión. *In: la ecofisiología vegetal. Una ciencia de síntesis.* Reigosa M. J.; Pedrol, N. y Sánchez, A. (Coord.). Editorial Paraninfo, S.A. Madrid, España. 451-464 pp.
- Sistema Nacional de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (SNIDRUS) y Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable del estado de Oaxaca (OEIDRUS). 2011. Maguey mezcal. Regiones productoras del estado de Oaxaca 2011. San Bartolo Coyotepec, Oaxaca. 79 p.
- Zimmerman, R. H. 1991. *Micropropagation: technology and application.* Ediciones Dordrecht. Kluwer Academic. 263 p.