

Rev. FCA UNCUYO. 2013. 45(2): 341-348. ISSN impreso 0370-4661. ISSN (en línea) 1853-8665.

Sustrato y dosis de fertirriego en la aclimatización de vitroplantas de *Agave americana* var. *oaxacencis*

Substrate and fertigation doses on acclimatization of micropropagated *Agave americana* var. *oaxacencis* plants

José Raymundo Enríquez del Valle, Anabey Estrada Siliás, Gerardo Rodríguez Ortiz, Vicente Arturo Velasco Velasco, Gisela Virginia Campos Ángeles

Originales: Recepción: 09/09/2012 - Aceptación: 09/09/2013

Nota científica

RESUMEN

Con la finalidad de asegurar la adaptación en invernadero de plantas de *Agave americana* var. *oaxacencis* obtenidas *in vitro*, se evaluó el efecto de sustratos y dosis de fertirriego en la aclimatización y crecimiento de 180 plantas. Este trabajo se realizó en un invernadero del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, México, a principios de 2012. Se utilizaron plantas recién salidas del laboratorio. El experimento se estableció según el diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 (sustratos: arena y perlita) x 5 (fertilización: 1, 25, 50, 75 y 100%). La unidad experimental fue una planta en un recipiente de plástico de 150 cm³ con 18 repeticiones. La fertilización se basó en la solución universal de Steiner y diariamente cada planta recibió a nivel de sustrato 10 mL durante 12 semanas. Se evaluó el crecimiento en hojas, tallo y raíz, realizando análisis de varianza y prueba de medias (Tukey, $\alpha = 0,05$). Todas las plantas se adaptaron, pero aquellas plantas establecidas en perlita lograron los mejores crecimientos en área foliar, volumen de raíz, peso fresco total, materia seca de raíz y total de planta. El tamaño de las plantas al término de su aclimatización estuvo en relación con la cantidad de nutrimentos de la solución nutritiva.

ABSTRACT

In order to ensure adaptation in the greenhouse of *Agave americana* var. *oaxacencis* plants obtained *in vitro*, the effect of media and fertigation dose on acclimatization and growth of 180 plants were evaluated. This work was conducted in a greenhouse at the Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, Mexico, in early 2012. Plants were fresh from the laboratory. The experiment was established according to completely randomized design and factorial arrangement with 2 (substrates: sand and perlite) x 5 (fertilization: 1, 25, 50, 75 and 100%). The experimental unit was a plant in a plastic container of 150 cm³ with 18 replications. Fertilization was based on the universal Steiner's solution, and daily, each plant received 10 mL at substrate level for 12 weeks. Growth was evaluated in leaves, stems and roots, performing analysis of variance and Tukey's test ($\alpha = 0.05$). All plants were adapted, but those plants which grew in perlite achieved the best growth on leaf area, root volume, total fresh weight and root dry matter and total biomass. The size of the plants at the end of the acclimatization stage was related to the amount of nutriments in the nutrient solution.

División de Estudios de Posgrado e Investigación. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Domicilio conocido, Ex Hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca, México. C. P. 71230. jenriquezdelvalle@yahoo.com

Palabras clave

aclimatización • *Agave americana*
• fertilización • micropropagación •
nutrición vegetal

Keywords

acclimatization • *Agave americana*
• fertilizer • micropropagation • plant
nutrition

INTRODUCCIÓN

La propagación *in vitro* es una alternativa para producir gran cantidad de plantas en un periodo corto, y una alternativa para la preservación y recuperación de especies que han disminuido significativamente sus poblaciones, debido al aprovechamiento excesivo sin planes de manejo (12). Hay referencias sobre la propagación clonal *in vitro* de varias especies de agave: *A. fourcroydes* Lem. (2, 11, 15); *A. tequilana* Weber (20), *A. cocui* Trelease (16). En la mayoría de estos trabajos se describen con detalle los procedimientos de cultivo *in vitro*, mientras que se ha investigado menos la transferencia de las plantas a condiciones *ex vitro* y el desempeño de las plantas en condiciones de vivero y campo.

En todos los esquemas de micropropagación, la aclimatización es la etapa final necesaria cuando las plantas propagadas se transfieren a contenedores con sustrato y en condiciones de invernadero, con la finalidad de adaptarse gradualmente a nuevas condiciones ambientales de humedad relativa, intensidad de luz, fluctuaciones de temperatura, limitado abastecimiento de nutrimentos y constante estrés por patógenos (3, 6, 13, 14).

La supervivencia de las plantas micropropagadas durante el periodo de aclimatización también depende de sus peculiaridades fisiológicas, estructurales y anatómicas resultantes de su desarrollo *in vitro* (4). La aclimatización debe garantizar que el mayor número de plantas sobreviva al proceso y conserven buena calidad sanitaria y fisiológica, condiciones importantes para que asuman crecimiento vigoroso cuando se transfieran al suelo (10).

Agave americana var. *oaxacensis* es una especie apreciada como materia prima para elaborar una bebida destilada denominada mezcal. Esta especie silvestre o cultivada en cantidades reducidas ha sido aprovechada excesivamente sin aplicar programas de manejo, por lo que sus poblaciones se han reducido.

Actualmente, se realizan actividades para propagar esta especie mediante el cultivo de tejidos vegetales, por lo que se requiere desarrollar procedimientos para la transferencia de las plantas de *in vitro* a *ex vitro* (5). Por lo expuesto anteriormente, cabe señalar que el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del sustrato y dosis de fertirriego en el crecimiento inicial y aclimatización en invernadero de plantas de *Agave americana* var. *oaxacensis* micropropagadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tratamientos y diseño experimental

Las plantas se obtuvieron del "Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales" y se establecieron durante 2012 en el invernadero de aclimatación del Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, México, cuya ubicación geográfica es la siguiente: 17°02' Latitud Norte, 96°44' Longitud Oeste y altitud de 1530 m. s. n. m.

El experimento se estableció según el diseño completamente al azar con arreglo factorial 2x5, esto es, dos tipos de sustratos -arena y perlita- y cinco dosis de fertilización basándose en la solución universal de Steiner (18): 1, 25, 50, 75 y 100% (diluciones). La unidad experimental se representó por una planta en un recipiente de plástico de 150 cm³ y hubo 18 repeticiones por tratamiento. Las 180 plantas de *Agave americana* var. *oaxacensis* recién salidas de laboratorio se mantuvieron por 12 semanas en invernadero; durante este tiempo se les proporcionó diariamente riegos intermitentes por nebulización de 10 s, cada 12 min de las 11:00 a las 14:00 h. Posterior al periodo de nebulización, se aplicaron a nivel de sustrato 10 mL/planta, de alguna dilución (1, 25, 50, 75 y 100%) de solución nutritiva, a las que se ajustó el pH a 5,8.

Los sustratos utilizados fueron: arena, que son partículas de mineral de SiO₂, con tamaño entre 0,5 y 2,0 mm de diámetro, capacidad de retención de agua de 56% aproximadamente y densidad aparente de 1,6 g cm⁻³ (9). La perlita es un silicato de aluminio de origen volcánico, con gránulo de color blanco a grisáceo de 1,0 a 4,0 mm. La porosidad va de 34 a 65%, por lo que presenta excelente capacidad de aireación y baja densidad (0,125 g cm³). Retiene la humedad en 63% en promedio. El pH varía de 6,5 a 7,5 (1, 9).

Variables evaluadas

Después de 12 semanas de aclimatación, se tomaron al azar ocho plantas/ tratamiento, en las cuales se cuantificaron las variables siguientes: número de hojas, longitud de la hoja más grande (cm), diámetro del tallo (mm), volumen de raíz (cm³), área foliar (cm²), número de raíces primarias, longitud de la raíz más larga (cm), peso fresco (g) y materia seca (mg) de parte aérea (hojas+tallo), raíz y total. Se utilizó vernier Scala 222A® (Gimbel Mexicana S. A. de C. V., México, D. F.) para la medición de diámetros; regla graduada para la medición de longitudes; probeta de 10 mL graduada para determinar volumen por desplazamiento en agua. El área foliar se cuantificó al colocar el conjunto de hojas en un acetato, del que se obtuvo una fotocopia; las imágenes de las hojas se recortaron y pesaron en balanza analítica y este peso se comparó con el correspondiente de un trozo de papel de la misma calidad y de área conocida. Para los pesos, se usó una balanza analítica Sartorius® modelo SAR TALENT1 (Miami, FLA, USA). Para secar la parte aérea y raíz de cada planta, estas se pusieron por separado en bolsas de papel, las que se colocaron durante 72 h en estufa modelo Shel Lab FX14® (Cornelius, OR., USA.) a 70°C.

En todas las variables evaluadas se realizó análisis de varianza y prueba de medias (Tukey, 0,05). Para las rutinas de análisis estadístico se utilizó el paquete Statistical Analysis System (17).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo, las plantas de *Agave americana* var. *oaxacensis* obtenidas *in vitro*, tuvieron en promedio 7 cm de altura, 5 hojas y tallo de 0,5 cm de diámetro, cuando se transfirieron del medio de cultivo a macetas con sustratos de perlita y de arena. Transcurridas las doce semanas del periodo de aclimatización se obtuvo que las dosis de fertilización y el sustrato tuvieron efecto en la magnitud de crecimiento de las plantas (tablas 1 y 2).

Tabla 1. Efecto del sustrato y la fertilización en hoja, tallo y raíz de *Agave americana*.
Table 1. Effect of substrate and fertilization on leaf, stem and root of *Agave americana*.

Factor	NH	LHG (cm)	DT (cm)	AF (cm ²)	NRP	VR (cm ³)
Sustrato						
Arena	7,2 a	12,5 a	1,3 a	49,9 b	7,8 a	1,7 b
Perlita	7,4 a	12,4 a	1,3 a	57,2 a	7,0 b	3,6 a
Fertilización (%)						
1	6,1 c	9,6 b	1,1 b	29,5 c	5,9 d	1,4 c
25	6,9 b	11,7 ab	1,2 ab	50,9 b	6,7 cd	2,4 b
50	7,3 b	12,5 ab	1,3 ab	55,1 b	7,4 bc	2,7 b
75	7,6 b	13,6 ab	1,4 ab	56,9 b	8,3 ab	2,8 b
100	8,6 a	15,27 a	1,6 a	75,3 a	8,8 a	4,1 a

NH = número de hojas; LHG = longitud de la hoja más grande; DT = diámetro del tallo; AF = área foliar; NRP = número de raíces primarias; VR = volumen de la raíz. En cada columna y tipo de factor, medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0,05).

NH = number of leaves; LHG = length of bigger leaf; DT = stem diameter; AF = foliar area; NRP = number of primary roots; VR = root volume. In each column and factor, means with the same letter are not statistically different (Tukey, 0.05).

Tabla 2. Efecto del sustrato y la fertilización en el peso fresco y seco de *Agave americana*.
Table 2. Effect of substrate and fertilization on fresh and dry weight of *Agave americana*.

Factor	Peso fresco (g)			Materia seca (mg)		
	Hojas + tallo	Raíz	Total	Hojas + tallo	Raíz	Total
Sustrato						
Arena	8,1 a	2,0 a	10,1 b	668 a	248 b	916 b
Perlita	9,5 a	3,3 a	12,8 a	722 a	308 a	1030 a
Fertilización (%)						
1	3,9 d	1,3 e	5,2 d	370 c	170 c	540 c
25	8,1 c	2,5 d	10,7 c	655 b	255 b	910 b
50	8,9 bc	2,7 c	11,6 bc	725 b	285 b	1010 b
75	9,6 b	2,9 b	12,5 b	770 b	300 b	1070 b
100	13,5 a	3,9 a	17,4 a	965 a	380 a	1345 a

En cada columna y tipo de factor, medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0,05).

In each column and factor, means with the same letter are not statistically different (Tukey, 0.05).

Los análisis estadísticos mostraron que el factor fertilización tuvo efectos altamente significativos ($p \leq 0,01$) en volumen de raíz, longitud de la raíz más larga, número de hojas, área foliar, número de raíces primarias, pesos frescos y materia seca acumulada de la raíz, de la parte aérea y total de la planta. El factor sustrato tuvo efectos altamente significativos ($p \leq 0,01$) en el volumen de la raíz, longitud de la raíz más larga, peso fresco y materia seca acumulada en la raíz, peso fresco de la parte aérea y total de la planta (tablas 1 y 2, pág. 344). Las plantas en el sustrato perlita tuvieron área foliar, volumen de raíz (tabla 1, pág. 344), peso fresco y materia seca (tabla 2, pág. 344) significativamente mayores que las plantas en el sustrato arena (Tukey, $p = 0,05$). Por el contrario, las plantas en la arena tuvieron significativamente mayor cantidad de raíces primarias. En cuanto al número de hojas, longitud de la hoja más larga y diámetro del tallo, las plantas en cualquiera de los sustratos no mostraron diferencias significativas (tabla 1, pág. 344).

Con respecto al factor fertilización, se observó que a medida que las plantas tuvieron mayor disponibilidad de nutrientes a través de la solución nutritiva, éstas mostraron significativo crecimiento adicional de hoja, tallo y raíz (tablas 1 y 2, pág. 344). Lo anterior pudo deberse a que las plantas al asimilar mayor cantidad de nutrientes, tuvieron mayor capacidad de síntesis de compuestos estructurales y metabólicos, lo que se tradujo en mayor crecimiento. Así, la fertilización proporcionó mayor disponibilidad de nutrientes minerales a las plantas, por lo que pudieron aumentar su capacidad fotosintética para la fijación de CO_2 y la acumulación de biomasa (19).

La interacción dosis de fertilización y sustrato mostró efectos altamente significativos ($p \leq 0,01$) en volumen de raíz, longitud de la raíz más larga, número de hojas, peso fresco de raíz, número de raíces primarias y peso fresco total de la planta (tabla 3 y 4, pág. 346).

Todas las plantas establecidas en ambos sustratos se adaptaron y mostraron crecimiento continuo durante las 12 semanas de aclimatación, pero el tamaño que estas plantas alcanzaron al final de dicha etapa fue afectado por la cantidad de nutrientes que tuvieron a disposición, ya que al recibir dosis creciente de nutrientes alcanzaron mayor tamaño. Resultados similares fueron descritos por Enríquez *et al.* (8) en plantas de *A. angustifolia* micropropagadas, que para su aclimatización en invernadero se establecieron durante 70 días en macetas con sustratos inertes, perlita o vermiculita y se les aplicó fertirriego.

Las plantas establecidas en los sustratos arena y perlita que se fertirrigaron con dosis de 1% de concentración de nutrientes tuvieron 5,5 y 6,6 hojas; 9,8 y 9,3 cm de longitud de la hoja; 26,1 y 32,7 cm^2 de área foliar (tabla 3, pág. 346), así como 530 y 550 mg de materia seca total (tabla 4, pág. 346), respectivamente. Las plantas en los mismos sustratos pero que se fertirrigaron a 100% de concentración de nutrientes, fueron significativamente más grandes (Tukey, 0,05), pues tuvieron respectivamente, 8,5 y 8,7 hojas; de 14,7 y 15,1 cm de longitud; 70,43 y 80,11 cm^2 de área foliar (tabla 3, pág. 346), 1150 y 1540 mg de materia seca acumulada total (tabla 4, pág. 346). Vale decir que conforme las plantas recibieron dosis crecientes de nutrientes, tuvieron mayor peso fresco y acumularon más materia seca en la parte aérea, raíz y total.

Tabla 3. Características de plantas de *Agave americana* micropropagadas que se sometieron durante 84 días de aclimatización a diferentes sustratos y dosis de fertilización.

Table 3. Characteristics of micropropagated *Agave americana* plants subjected for 84 days of acclimatization to different substrates and fertilization dose.

S	TRAT		LHG (cm)	DT (cm)	AF (cm ²)	NRP	VR (cm ³)
	F	NH					
Arena	1	5, 50 d	9,88 a	1,15 a	26,21 e	5,9 c	1,0 e
Perlita	1	6,62 cd	9,30 a	1,06 a	32,74 de	5,9 c	1,8 de
Arena	25	6,75 bcd	11,71 a	1,20 a	49,65 cd	6,5 bc	1,4 e
Perlita	25	7,12 abcd	11,65 a	1,28 a	52,18 bc	6,8 bc	3,3 bc
Arena	50	7,50 abc	12,38 a	1,25 a	50,06 cd	7,8 abc	1,7 de
Perlita	50	7,12 abcd	12,53 a	1,31 a	60,04 abc	7,0 bc	3,6 cd
Arena	75	7,75 abc	14,02 a	1,41 a	53,10 bc	9,0 ab	1,8 de
Perlita	75	7,37 abc	13,25 a	1,38 a	60,75 abc	7,5 abc	3,8 b
Arena	100	8,50 ab	14,77 a	1,72 a	70,43 ab	9,9 a	2,6 cd
perlita	100	8,75 a	15,08 a	1,42 a	80,11 a	7,6 abc	5,5 a

En cada columna, medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0,05). TRAT = tratamiento; S = sustrato; F = dosis de fertilización; NH = número de hojas; LHG = longitud de la hoja más grande; DT = diámetro de tallo; AF = área foliar; NRP = número de raíces primarias; VR = volumen de raíz.

In each column, means with the same letter are not statistically different (Tukey, 0.05). TRAT = treatment; S = substrate; F = fertilization dose; NH = number of leaves; LHG = length of bigger leaf; DT = stem diameter; AF = foliar area; NRP = number of primary roots; VR = root volume.

Tabla 4. Pesos frescos y materia seca acumulada en la parte aérea, raíz y total de las plantas de *Agave americana* var *oaxacensis* micropropagadas cuando habían transcurrido 84 días de la etapa de aclimatización.

Table 4. Fresh weight and accumulated dry matter of aboveground part, root and total of micropropagated *Agave americana* var *oaxacensis* plants when 84 days of acclimatization stage had passed.

S	F	Peso fresco (g)			Materia seca (mg)		
		Parte aérea	Raíz	Total	Parte aérea	Raíz	Total
Arena	1	3,84 d	1,16 d	5,05 e	360 c	170 c	530 d
Perlita	1	4,05 d	1,44 d	5,49 e	380 c	170 c	550 cd
Arena	25	7,90 c	1,88 cd	9,78 d	650 bc	230 bc	880 bc
Perlita	25	8,32 c	3,06 b	11,38 bcd	660 bc	280 bc	940 bcd
Arena	50	7,96 c	2,02 cd	9,98 d	750 b	250 bc	1000 b
Perlita	50	9,78 bc	3,43 b	13,21 abcd	700 bc	320 b	1020 b
Arena	75	8,78 c	2,05 cd	10,83 cd	760 ab	260 bc	1020 b
Perlita	75	10,41 bc	3,67 b	14,08 abcd	780 ab	340 ab	1120 b
Arena	100	12,20 ab	2,76 bc	14,96 b	820 ab	330 ab	1150 ab
Perlita	100	14,83 a	5,00 a	19,83 a	1110 a	430 a	1540 a

En cada columna, medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0,05). TRAT = tratamiento; S = sustrato; F = dosis de fertilización; A = arena; P = perlita

In each column means with the same letter are not statistically different (Tukey, 0.05). TRAT = treatment; S = substrate; F = fertilization dose; A = sand; P = perlite.

Resultados similares se encontraron en plantas de *A. angustifolia* Haw. micropropagadas, aclimatizadas durante 70 días en invernadero en contenedores con sustrato perlita y posteriormente con mezclas de arena-compost en vivero. Se encontró, al igual que en esta investigación, que las plantas que recibieron solución nutritiva tuvieron crecimiento superior que las no fertirrigadas, aun cuando ambos tipos de plantas hubieran estado en sustratos con contenido alto de materia orgánica (7).

CONCLUSIONES

Todas las plantas de *Agave americana* var. *oaxacensis* obtenidas *in vitro* que se establecieron en macetas con sustratos de perlita o arena, en condiciones de invernadero para su aclimatización durante 84 días, al término de este tiempo todas se adaptaron. Las plantas en perlita mostraron los mejores crecimientos en área foliar (57,2 cm²), volumen de raíz (3,6 cm³), peso fresco total de planta (12,8 g), biomasa de raíz (308 mg) y biomasa total de planta (1030 mg).

El tamaño que obtuvieron las plantas al término de su aclimatación estuvo en relación con la cantidad de nutrimentos en la solución nutritiva, esto es, que el incrementó en la concentración de la solución nutritiva en 1, 25, 50, 75 y 100%, tomando como referencia el 100% la Solución Universal de Steiner, generó efectos significativos en todas las variables evaluadas independientemente del sustrato utilizado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abad, M.; Martínez, P. F.; Martínez, M. D.; Martínez, J. 1993. Evaluación agronómica de los sustratos de cultivo. *Acta Horticulturae*. 11: 141-154.
2. Binh, L. T.; Muoi, L. T.; Oanh, H. T. K.; Thang, T. D.; Phong, D. T. 1990. Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23: 67-70.
3. Díaz, L. P.; Medina, L. F.; Latife, J.; Sosa S. B. 2004. Aclimatación de plantas micropropagadas de caña de azúcar utilizando el humus de lombriz. *Revista de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad del Zulia* 2(33): 115-128.
4. Domínguez, T. G.; Donayre G., M. L. 2006. Aclimatación de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. producida *in vitro*. *Ecología Aplicada* 5(1 y 2): 67-74.
5. Enríquez del Valle, J. R. 2008. La propagación y crecimiento de agaves. Fundación Produce Oaxaca A.C. e Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. México. 48 p.
6. Enríquez del Valle, J. R.; Carrillo-Castañeda, G.; Sánchez, M. P.; Rodríguez, M. N. M.; Mendoza, C. M. C. 2000. Fertilización para la óptima adaptación, vigor de vitroplantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) *Rev. Fitotec. Mex.* 23: 59-68.
7. Enríquez del Valle, J. R.; Velasco, V. V. A.; Campos, G. V. A.; Hernández-Gallardo, E.; Rodríguez-Mendoza, M. N. 2009. *Agave angustifolia* plants grown with different fertigation doses and organic substrates. *Acta Horticulturae* 843: 49-55.
8. Enríquez del Valle, J. R.; Cruz-Valdez, I.; Carrillo-Castañeda, G. 2012. Acclimatization of *Agave angustifolia* Haw. vitroplants in inert substrates and fertigated with different nutrimental dose. *Acta Horticulturae* 947: 101-104.
9. Handreck, K. A. 1983. Particle size and the physical properties of growing media for containers. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 14: 209-222.
10. Hazarika, B. N. 2003. Acclimatization of tissue- cultured plants. *Current Science* 85(12-25): 1704-1712.
11. Madrigal Lugo, R.; Pineda-Estrada, F.; Rodríguez de la O, J. L. 1990. *Agave*. p. 206-227. *In: Handbook of Plant Cell Culture, Vol 5. Ornamental Species*. P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp and Y. P. S. Bajaj (eds.). McGraw-Hill. New York.

12. Pedrosa-Manrique, A. J.; Tupaz-Villacorte, A. W. 2008. Micropropagación de *Ilex kunthiana* Triana & Planchon (Aquifoliaceae), una especie de gran importancia en programas de revegetación. *Revista Colombiana de Biotecnología* 10(2): 72- 84.
13. Pierik, R. L. M. 1990. *In vitro* Culture of Higher Plants. Marthinuis Nijhoff Publishers, Dordrecht. Netherlands. p. 49-72.
14. Pospíšilová, J.; Tichá, I.; Kadlec, P.; Haisel, D.; Plzák, S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum* 42(4): 481-497.
15. Robert, M. L.; Herrera, J. L.; Contreras, F.; Scorer, K. L. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequén). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 8: 37-48.
16. Salazar, E.; González, P.; Hernández, C. 2009. Multiplicación in vitro de *Agave cocui* Trelease a través de yemas axilares. *Agronomía Tropical* 59(2): 129-135.
17. SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT 9.1 User's guide. SAS Institute, Cary, N.C. USA. 4979 p.
18. Steiner, A. A. 1984. The universal nutrient solution. International Society For Soilless Culture (ISOSC). Sixth International Congress on Soilless Culture. Lunteren. p. 633-650.
19. Uvalle B., J. X.; Vélez G., C. 2007. Nutrición del Agave tequilero (*Agave tequilana* Wever var. azul). En: Rulfo V., F. O.; Pérez D., J. F.; del Real Laborde, J. I.; Byerly M., Keir F. (eds.). Conocimiento y prácticas agronómicas para la producción de *Agave tequilana* Weber en la zona de denominación de origen del tequila. Instituto Nacional de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. 69-88 p.
20. Valenzuela-Sánchez, K. K.; Juárez-Hernández, R. E.; Cruz-Hernández, A.; Olalde-Portugal, V.; Valverde, M. E.; Paredes-López, O. 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 42(4): 336-340.