

DOSIS DE FERTIRRIEGO DURANTE LA ACLIMATIZACIÓN DE PLANTAS DE *Agave americana* MICROPROPAGADAS¹

[FERTI-IRRIGATION DOSE DURING ACCLIMATIZATION OF MICROPROPAGATED *Agave americana* PLANTS]

Rosalba Pérez-Santiago, José Raymundo Enríquez-del Valle[§], Ernesto Castañeda-Hidalgo, Vicente Arturo Velasco-Velasco, Gerardo Rodríguez-Ortiz, Gisela Virginia Campos-Ángeles

Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Ex Hacienda de Nazareno, Xoxocotlán, Oaxaca. C. P. 71230. Tel. 01(951) 5170788. [§]Autor responsable (jenriquezdelvalle@yahoo.com)

RESUMEN

Agave americana var. *oaxacensis* se usa para producir una bebida destilada denominada mezcal. La especie se cultiva en pequeñas extensiones que no abastecen la demanda, por lo que agricultores magueyeros están interesados en propagar y establecer plantaciones de esta especie. El objetivo fue evaluar durante 12 semanas, de mayo a julio del 2012, bajo condiciones de invernadero, la aclimatación de plantas de *A. americana* var. *oaxacensis* micropropagadas y fertirrigadas con soluciones nutritivas a concentraciones diferentes de nutrimentos de la solución Steiner. Se ha realizado la propagación *in vitro* de esta especie y debido a que en un esquema de micropropagación, la etapa de aclimatación afecta la sobrevivencia y calidad de las plantas, en este trabajo se propuso evaluar la aplicación de fertirriego a las plantas durante su aclimatación. Noventa plantas de *A. americana* micropropagadas, que tenían en promedio de 13 a 15 cm de altura y de 5 a 6 hojas, se transfirieron de *in vitro* a macetas con sustrato de perlita. El total de plantas se separó en seis grupos para aplicarles diariamente durante 84 días diferentes diluciones de la solución nutritiva Steiner (5, 20, 40, 60, 80 y 100%). Al término de esta etapa los resultados mostraron que conforme las plantas se fertirrigaron con concentraciones cada vez mayores de nutrimentos, estas fueron más grandes, de tal manera que las plantas fertirrigadas a 5% y las plantas fertirrigadas al 100% de concentración de nutrimentos tuvieron 10.0 y 14.2 cm de altura, 3.7 y 6.4 hojas, el tallo de 1.3 y 1.9 de diámetro, su raíz de 2.5 y 5.6 cm³ de volumen, respectivamente.

Palabras clave: *Agave americana*, aclimatación, fertirrigación, micropropagación.

ABSTRACT

Agave americana var. *oaxacensis* is used to produce a distilled liquor called mescal. The species is grown in small areas that do not supply the demand, and so, the maguey farmers are interested in propagate plants and plantations of this species. The objective was to evaluate during 12 weeks, from May to July 2012, under greenhouse conditions, the acclimatization of micropropagated *A. americana* var. *oaxacensis* plants and fertigated with nutrient solutions at different concentrations of the Steiner's nutrient solution. The *in vitro* propagation of this species has been done and because the acclimatization stage affects survival and quality of plants in a micropropagation scheme, the goal of this work was to evaluate the application of fertigation to plants during their acclimatization. Ninety micropropagated *A. americana* plants which had an average of 13 to 15 cm height and 5 to 6 leaves were transferred from *in vitro* to pots with perlite substrate. The total of plants were separated into six groups to apply them daily for 84 days different dilutions of the Steiner's nutrient solution (5, 20, 40, 60, 80 and 100%). At the end of this stage, the results showed that as the plants were fertigated with increasing concentrations of nutrients, these were larger, and so the plants fertigated at 5% and the plants fertigated at 100% of nutrient concentration achieved 10.0 and 14.2 cm height, 3.7 and 6.4 leaves, 1.3 and 1.9 cm of stem diameter, the roots had 2.5 and 5.6 cm³ in volume, respectively.

Index words: *Agave americana*, acclimatization, fertigation, micropropagation.

INTRODUCCIÓN

En el continente Americano existen alrededor de 166 especies de agave. En el territorio mexicano, las poblaciones rurales usan diferentes especies de *Agave* con fines diversos y en Oaxaca, México, un uso muy arraigado es el mezcal. Éste se obtiene de la fermentación y destilación del líquido concentrado de los azúcares de la piña (tallo y base de las hojas) de la planta (Valenzuela, 2006).

Para la producción de mezcal, las especies de maguey que más se usan son *A. angustifolia*, *A. potatorum*, *A. karwinskii* y *A. americana*. La primer especie es ampliamente propagada y cultivada, mientras que las otras especies son poco cultivadas o silvestres, recolectadas particularmente en los bosques de pino-encino, selva baja caducifolia y pastizales de las regiones templadas y áridas (Pérez, 1998). En Oaxaca, el *A. americana* var. *oaxacensis* se cultiva en pequeñas extensiones y se establece en límites de terrenos, particularmente en el distrito de Ocotlán y la Sierra Sur del estado. Su tallo es de mayor tamaño y contiene cantidades similares de azúcares que *A. angustifolia* (Valenzuela, 2006). Agricultores magueyeros de Oaxaca están interesados en propagar y establecer plantaciones de especies de agaves diferentes al maguey espadín (*A. angustifolia*), por considerar que el mezcal que se produciría con materia prima de otras especies ayudaría a diferenciar su producto, que tendría mayor valor comercial.

El cultivo de tejidos vegetales se ha usado como una alternativa para propagar asexualmente diversas especies de agaves: *A. tequilana*, *A. fourcroydes*, *A. arizonica* y *A. angustifolia*. De esta última se tienen datos de su propagación *in vitro*, de la aclimatización durante 70 días en invernadero de las plantas obtenidas y del crecimiento de éstas durante más de un año en vivero. Se ha demostrado la importancia del tipo de sustrato y el abastecimiento de nutrimentos en su efecto sobre el crecimiento y calidad de las plantas al final de la etapa de aclimatización (Enríquez-del Valle *et al.*, 2000; Enríquez-del Valle *et al.*, 2012). La metodología desarrollada para *A. angustifolia* se está aplicando en *A. americana* var. *oaxacensis*. En las plantas que se obtienen *in vitro*, interesa evaluar su aclimatización y crecimiento inicial en invernadero bajo el efecto de diferentes dosis del abastecimiento de nutrimentos, con la finalidad de lograr que la mayor cantidad de plantas sobreviva al finalizar esta etapa, y también que los individuos sean de calidad al ser trasplantados a suelo.

Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar durante 12 semanas bajo condiciones de invernadero la aclimatización de plantas de *Agave americana* var. *oaxacensis* micropropagadas y fertirrigadas con soluciones nutritivas a diferentes concentraciones de nutrimentos de la solución Steiner (1984).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó durante los meses de mayo a julio 2012, en las instalaciones del laboratorio de micropropagación del Instituto tecnológico del Valle de Oaxaca, ubicado en los Valles Centrales de Oaxaca. Brotes adventicios de *A. americana* var. *oaxacensis* se obtuvieron *in vitro* a partir de tejidos de tallo que se establecieron en un medio de cultivo preparado con agua destilada, las sales minerales de Murashige y Skoog (1962), 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol, 1 mg L⁻¹ de benziladenina (BA). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 antes de agregar 5.4 g L⁻¹ de agar. Los cultivos se mantuvieron durante ocho semanas en condiciones de incubación de 18-28 °C, iluminación fluorescente blanca a 100 µmol m⁻² s⁻¹ de flujo de fotones fotosintéticos en fotoperiodos de 16 h y 8 h de oscuridad.

Posteriormente, en los grupos de brotes que se formaron en cada explanto se seleccionaron aquellos que tenían de 13 a 15 cm y para inducir su enraizado, se separaron individualmente, transfiriéndose a recipientes de vidrio de 160 cm³ que contenían 20 mL de medio de cultivo con consistencia de gel, preparado con las sales inorgánicas MS a 75% de concentración de nutrimentos 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.4 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de myo-inositol y 1 mg L⁻¹ de ácido indol-butírico (AIB). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 antes de agregar 5.4 g L⁻¹ de agar. Los cultivos se llevaron al cuarto de incubación en donde recibieron durante seis semanas condiciones similares que en la etapa anterior.

Las plantas obtenidas y cuyas hojas más grandes eran desde 13 a 15 cm de longitud se extrajeron del medio de cultivo, sus raíces fueron enjuagadas para eliminar restos del medio de cultivo y se establecieron en macetas de 225 cm³ que contenían como sustrato el material inerte perlita. Después de establecer las plantas de forma individual en sus respectivas macetas se encerraron bajo cubiertas de polietileno transparente para mantener una alta humedad relativa (80-95%) a su alrededor.

Las plantas en maceta se llevaron a invernadero y se colocaron sobre mesas de concreto de 120 cm de ancho, 1200 cm de largo y 90 cm de alto. La etapa de aclimatización transcurrió durante 12 semanas en donde las plantas estuvieron expuestas a radiación solar a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y durante las semanas 1, 2, 3 y 4 de esta etapa, a partir de las 15:00 h la cubierta que las protegía se les quitaba durante 15, 30, 45 y 60 minutos respectivamente, para exponerlas a ventilación y disminuir así la humedad relativa como estímulo para su aclimatización. A la semana cuatro las plantas ya no mostraron síntomas de marchitamiento, por lo que a partir de la quinta semana se les retiró permanentemente las cubiertas de polietileno.

De las 90 plantas que en total se evaluaron en la etapa de aclimatización se dividieron en seis grupos de 15 plantas cada uno para aplicarles, 10 mL de solución nutritiva con alguno de los tratamientos de dosis de fertilización que consistieron en diluciones (5, 20, 40, 60, 80 y 100%) de la concentración de nutrimentos de la solución universal Steiner (1984). El experimento se estableció según un diseño completamente al azar. La unidad experimental consistió de una planta en cada maceta y se tuvieron 15 repeticiones por tratamiento.

Al final del experimento, de cada tratamiento se cosecharon al azar 10 plantas para evaluar el número de hojas, la longitud y ancho de la hoja más grande, el área foliar, el diámetro del tallo, los pesos frescos y secos de tallo, hojas y raíz, el volumen de hojas y raíz, así como número y longitud de raíces. Los datos se sometieron a análisis de varianza y comparación de medias. Para la rutina de análisis estadístico se utilizó el programa computacional Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute Inc., 2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los esquemas de micropropagación, la aclimatización es la etapa final necesaria, en que las plantas obtenidas se transfieren a contenedores con sustrato y condiciones de invernadero, donde deben adaptarse gradualmente a nuevas condiciones ambientales, tales como, humedad relativa baja, radiación solar alta, fluctuaciones de temperatura y constante estrés de resistencia a enfermedades (Pierik, 1990; Pospíšilová *et al.*, 1999).

La supervivencia de las plantas micropropagadas durante el periodo de aclimatización depende fundamentalmente de sus peculiaridades fisiológicas, estructurales y anatómicas resultantes de su desarrollo *in vitro* (Domínguez y Donayre, 2006; Portillo, 2007). Este proceso debe garantizar que el mayor número de plantas sobreviva al proceso y conserven calidad sanitaria y fisiológica, condiciones importantes para que asuman crecimiento vigoroso cuando se transfieran a suelo (Hazarika, 2003). Si durante la aclimatización las plantas se someten a niveles adecuados de temperatura, humedad, radiación solar, sustratos y abastecimiento de nutrimentos, la calidad que éstas posean al final de dicha etapa tendrá efecto en etapas posteriores de vivero y el rendimiento económico del cultivo (Pospíšilová *et al.*, 1999; Enríquez-del Valle *et al.*, 2000).

Para propagar *in vitro* el *Agave americana* var. *oaxacensis* se usó la metodología descrita para *A. angustifolia* (Enríquez *et al.*, 2008). Las plantas obtenidas tenían hojas delgadas y no succulentas. Éstas fueron transferidas de *in vitro* a condiciones de invernadero en donde se expusieron a radiación solar disminuida 60%; se establecieron en macetas con sustrato de perlita que es un material inerte, de baja densidad aparente (0.37 g cm^{-3}), posee 67.85% de poros, de los cuales 9.8 % es de aireación, que permite un adecuado drenaje y mantiene suficientes espacios porosos para la respiración de la raíz. Sin embargo, por tratarse de un sustrato inerte es necesario aplicar soluciones nutritivas a las plantas. Transcurridos 70 días en tales condiciones, se logró que todas las plantas de *A. angustifolia* se adaptaran, mostraran crecimiento, su morfología ya presentaba características adecuadas para transferir estas plantas a suelo en vivero, en donde se expusieron a radiación plena y menor frecuencia de riegos (Enríquez-del Valle *et al.*, 2012).

Las plantas de *A. americana* obtenidas *in vitro* tenían de 5 a 6 hojas y su hoja mayor de 13 a 15 cm de altura, cuando se transfirieron del medio de cultivo a macetas con sustrato de perlita. Cuando habían transcurrido 84 días de aclimatización en invernadero, todas las plantas se adaptaron y los análisis de varianza (Cuadros 1 y 2) mostraron que las diferentes diluciones tuvieron efectos diferentes altamente significativos ($P \leq 0.01$) en la altura de planta, número de hojas, ancho de la hoja más larga, diámetro del tallo, volumen de hojas, volumen de tallo, peso fresco (hojas, tallo y raíces), sin embargo las diferentes dosis de fertilización no mostraron efectos significativos (Tukey, $P = 0.05$) diferentes en grosor de tallo, longitud de raíces y número de raíces.

Cuadro 1. Resumen del análisis de varianza de las características del *Agave americana* obtenidas *in vitro* y que durante 84 días de aclimatización recibieron diferentes dosis de nutrimentos.

F.V.	Gl	Cuadrados medios y significancia					
		AP (cm)	NH	AH (cm)	DT (mm)	PFH (g)	VH (cm ³)
Trat.	5	25.22**	1.33**	1.05**	0.57**	194.95**	215.69**
Error	54	4.55	3.07	0.12	0.07	20.52	20.43
Total	59						

F. V. fuente de variación; Trat. = Tratamiento; Gl = Grados de libertad; AP = Altura de planta; NH = Número de hojas; AH = Ancho de la hoja más larga; DT = Diámetro del tallo; PFH = Peso fresco de las hojas; VH = Volumen de las hojas; **valor de F, altamente significativo con $P \leq 0.01$.

Cuadro 2. Resumen del análisis de varianza de las características de plantas de *Agave Americana* micropropagadas y que durante 12 semanas de aclimatización recibieron diferentes dosis de nutrimentos.

F. V.	Gl	Cuadrados medios y significancia					
		PFTa 8 (g)	GTa (mm)	PFRa (g)	VRa (cm ³)	LoRa (cm)	NRa
Trat.	5	0.11**	0.02 ^{ns}	8.91**	14.83**	8.19 ^{ns}	0.20 ^{ns}
Error	54	0.01	0.01	2.10	2.36	15.09	2.75
Total	59						

F. V. fuente de variación; Trat. = Tratamiento; Gl = Grados de libertad; PFTa = Peso fresco de tallo; GT = Grosor de tallo; PFRa = Peso fresco de la raíz; VRa = Volumen de la raíz; LoRa = Longitud de la raíz más larga; NRa = Número de raíces; **valor de F, altamente significativo con $P \leq 0.01$; ns = valor de F, no significativo con $P > 0.05$.

Altura de planta

Esta variable fue cuantificada en la fecha que se trasplantaron de *in vitro* a maceta con un sustrato y posteriormente cada 15 días, durante las 12 semanas de aclimatización. La Figura 1a muestra que al iniciar el experimento las plantas tenían en promedio 13 a 15 cm de altura, de 5 a 7 hojas y fue en el transcurso de los días 1 a 44 posteriores al trasplante que su tamaño promedio disminuyó. Lo anterior debido a que ocurrió la senescencia de hojas que la planta formó durante su cultivo *in vitro* y que en el transcurso de la aclimatización fueron gradualmente sustituidas por hojas nuevas. De tal manera que posterior al día 44 de aclimatización las nuevas hojas ya eran lo suficientemente grandes para que las plantas mostraran incremento en altura (Figura 1b) en respuesta a dosis crecientes de solución nutritiva.

En el transcurso de los días del 16 al 30 las plantas sometidas a fertirriego con dosis de fertilización al 100 y 60%, mostraron incremento en el número de hojas, a pesar de que ocurría la senescencia de las hojas provenientes del cultivo *in vitro*; sin embargo, en las plantas que recibieron fertirriego con las dosis más bajas (5, 20 y 40%) su cantidad de hojas decreció paulatinamente durante todo el periodo de aclimatización pues la cantidad de hojas que morían en la planta fue superior que las nuevas hojas (Figura 2a).

En el día 72 después del trasplante las plantas que recibieron la solución nutritiva al 100% de concentración de nutrimentos tuvieron 14.28 cm de altura, magnitud mayor y significativamente diferente a los 10.0 y 11.4 cm de las plantas que se fertirrigaron con dosis de 5 a 20% de nutrimentos (Figura 1b).

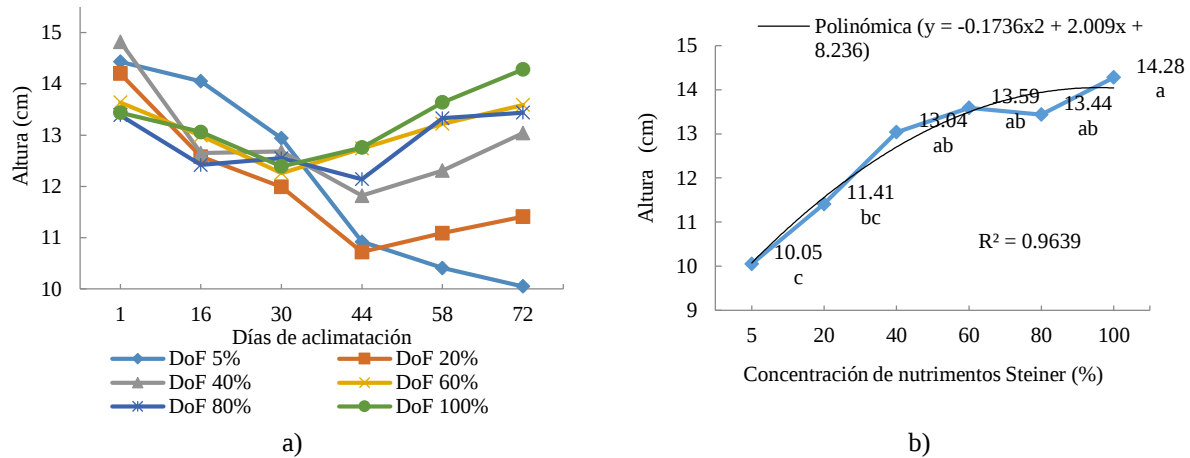


Figura 1. Crecimiento en altura de planta de *Agave americana*: a) en el transcurso de las 12 semanas de aclimatación. b) Al término del período de aclimatación de 72 días durante los cuales se les aplicaron soluciones nutritivas con concentración diferente de nutrientes (plantas obtenidas *in vitro*). DoF = dosis de fertilización. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey, 0.05).

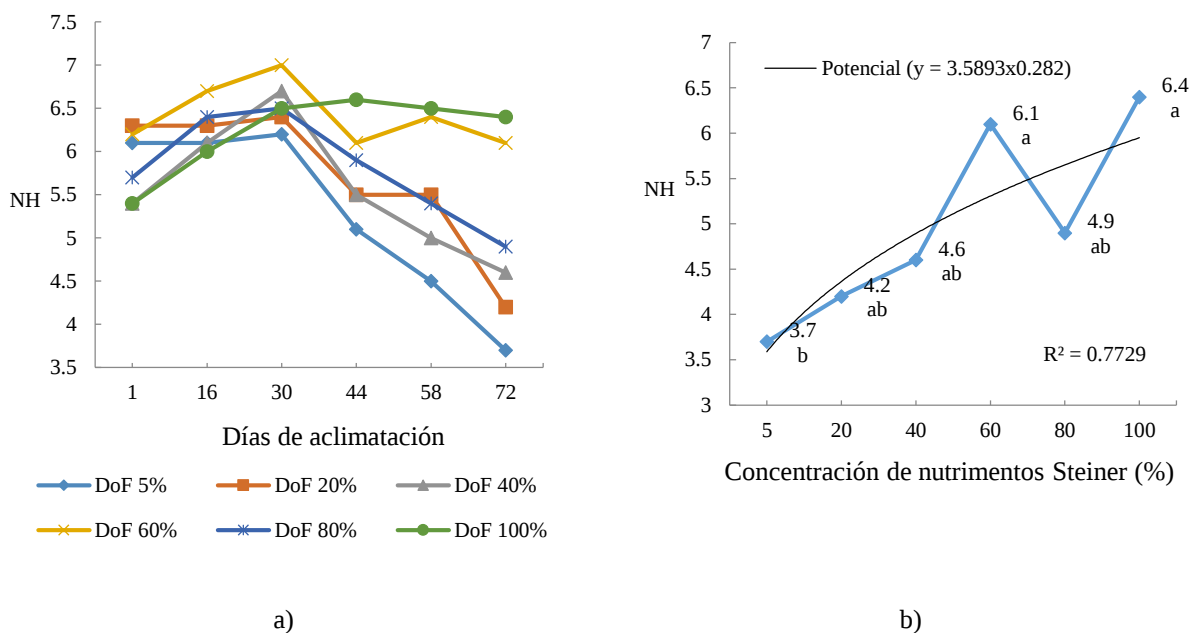
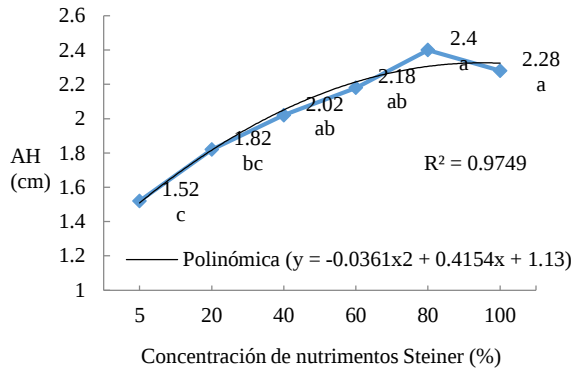


Figura 2. Cantidad de hojas (NH) en plantas de *Agave americana* micropropagadas: a) A 72 días de aclimatación recibieron diferentes diluciones de solución nutritiva. b) Al término del periodo de aclimatación de 72 días durante los cuales se les aplicaron soluciones nutritivas con concentración diferente de nutrientes. DoF = dosis de fertilización. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey, 0.05).

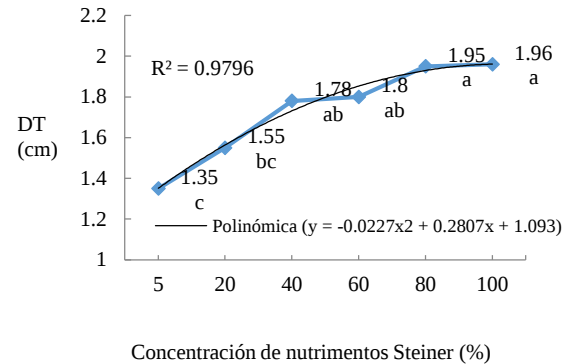
Cuando habían transcurrido 72 días de aclimatación las plantas que recibieron solución nutritiva del 60 y las que recibieron la solución al 100% tuvieron seis hojas en promedio, significativamente diferente a las cuatro hojas que tuvieron las plantas que fueron fertilizadas con dosis menores a las antes mencionadas (Figura 2b).

Ancho de la hoja mayor

En el día 72 después del trasplante las plantas que recibieron la solución nutritiva al 80% de concentración de nutrientes su hoja mayor tuvo 2.4 cm de ancho, magnitud mayor y significativamente (Tukey, 0.05) diferente al 1.5 cm de ancho de hoja de las plantas que habían sido fertirrigadas con dosis del 5% de nutrientes (Figura 3a).



a)



b)

Figura 3. Anchura de hojas (AH) (a) y diámetro de tallo (DT) (b) de *Agave americana* obtenido *in vitro* cuando habían transcurrido 84 días de aclimatización durante los cuales se les aplicó solución nutritiva con concentración diferente de nutrientes. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey, 0.05).

Diámetro del tallo

Al inicio de la aclimatización, las plantas en los diversos tratamientos tenían sus tallos 0.8 a 0.9 de diámetro. Al término de los 72 días de aclimatización durante los cuales recibieron un fertirriego diario con solución nutritiva, las plantas alcanzaron cada vez mayor tamaño conforme se fertirrigaron a concentración creciente de nutrientes en el rango de 5 a 100% de la formulación Steiner (1984), de tal manera que las plantas que se fertirrigaron a 5% de nutrientes y las que recibieron 100% de nutrientes tuvieron 1.35 y 1.96 cm de diámetro de tallo, magnitudes significativamente diferentes (Tukey, 0.05) (Figura 3b).

Crecimiento de plantas

Al término de los 72 días de aclimatización durante los cuales las plantas recibieron diariamente riegos con solución nutritiva, las plantas alcanzaron cada vez mayor tamaño conforme recibieron diariamente riegos con concentración creciente de nutrientes en el rango de 5 a 100% de la formulación Steiner (1984), de tal manera que las plantas que recibieron la solución nutritiva diluida a 5% de nutrientes y las que recibieron la solución nutritiva a 100% de nutrientes, tuvieron 1.35 y 1.96 cm de diámetro de tallo, 4.05 y 16.42 g de peso fresco foliar (Figura 4a), 4.4 y 17.4 cm³ de volumen foliar (Figura 4b), 0.122 y 0.40 g de peso fresco de tallo, 0.52 y 0.54 cm de grosor de tallo, 2.44 y 5.1 g de peso fresco de la raíz (Figura 5a), 2.5 y 5.6 cm³ de volumen de raíz (Figura 5b), respectivamente, magnitudes significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

Ambos grupos de plantas formaron en promedio 9.2 y 9.1 raíces, con la raíz más larga de 17.61 y 17.3 cm, magnitudes no significativamente diferentes (Tukey, 0.05). Sin embargo, el segundo grupo de plantas tuvo un sistema de raíz de mayor tamaño, tal como lo muestran los volúmenes y pesos frescos, debido a que las raíces fueron más ramificadas.

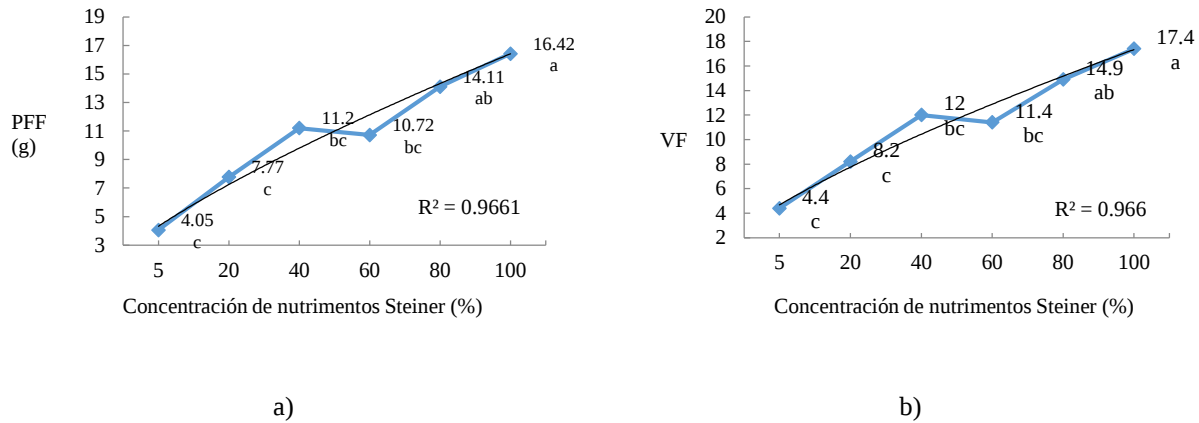


Figura 4. Peso fresco foliar (PFF) (a) y volumen foliar (VF) (b) de plantas de *Agave americana* obtenidas *in vitro* al término de 12 semanas del periodo de aclimatización durante las cuales se le aplicó solución nutritiva con concentración diferente de nutrientes. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey, 0.05).

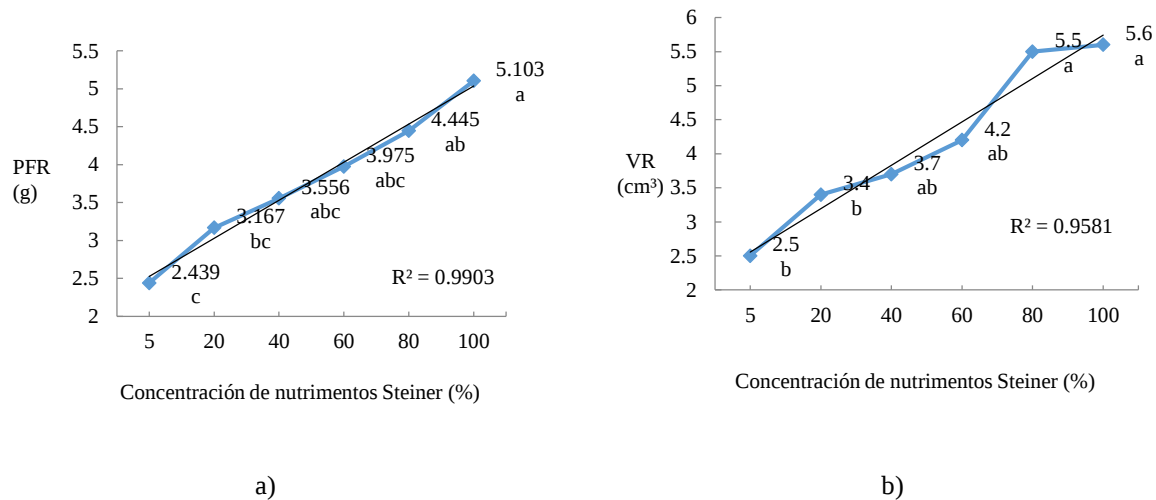


Figura 5. Peso fresco de las raíces (PFR) (a) y volumen de raíz (VR) (b) de plantas de *Agave americana* obtenidas *in vitro* al término de 72 días de aclimatización durante los cuales se les aplicó solución nutritiva con concentración diferente de nutrientes. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey, 0.05).

CONCLUSIONES

Plantas micropropagadas de *Agave americanavar. oaxacensis* durante 72 días de su aclimatización en invernadero sustituyeron las hojas que habían formado *in vitro* por otras nuevas. La cantidad y tamaño de las nuevas hojas que formaron las plantas fue afectado por la concentración de nutrientes proporcionados en la solución nutritiva. Los datos reunidos durante las 12 semanas de aclimatización confirman la hipótesis formulada al inicio de la investigación, la cual pronosticaba una relación positiva entre la magnitud de crecimiento vegetativo y la dosis de fertilización que recibieron las plantas.

LITERATURA CITADA

Domínguez, T. G. y G.M. L. Donayre. 2006. Aclimatación de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. producida *in vitro*. Ecología Aplicada. 5(1 y 2):67-74.

- Enríquez, V. J.R. 2008. La propagación y crecimiento de agaves. Fundación Produce Oaxaca A.C. e Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Oaxaca, México. 48 p.
- Enríquez-del Valle, J. R., G. Carrillo-Castañeda, P., Sánchez-García, M. N. Rodríguez-Mendoza, y M.C. Mendoza. 2000. Fertilización para la óptima adaptación y vigor de plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) obtenidas *in vitro*. Revista Fitotecnia Mexicana. 23:59-68.
- Enríquez-del Valle, J.R., I. Cruz-Valdez y G. Carrillo-Castañeda. 2012. Acclimatization of *Agave angustifolia* Haw. vitroplants in inert substrates and fertigated with different nutrimental dose. Acta Horticulturae. 947: 101-104.
- Hazarika, B. N. 2003. Acclimatization of tissue- cultured plants. Current Science. 85(12-25): 1704-1712.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Pérez, P. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. pp. 193-206.
- Pierik, R. L. M. 1990. *In vitro* culture of higher plants. Marthinius Nijhoff Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp.49-72.
- Portillo, L. 2007. Somaticembryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In vitro* cell. Dev. Biol-Plant 43:323-328.
- Pospíšilová, J., I. Tichá, P. Kadlecek, D. Haisel and S. Plzáková. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. Biologia Plantarum. 42(4): 481-497.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS/STAT 9.1 User's guide. SAS Institute, Cary, N.C. USA. 4979 p.
- Steiner, R. 1984. The universal nutrient solution. In: Proc. Sixth International Congress on Soilless Culture. International Soc. Soilless Culture. The Netherlands. pp. 633- 647.
- Valenzuela, S. K.K. 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *in vitro* cell. Dev Biol. Plant. 42:336-340.