

# Propuesta de medio de cultivo para el enraizamiento *in vitro* de *Agave angustifolia* Haw. (Asparagales: Asparagaceae)

Proposal of a culture medium for *in vitro* rooting of *Agave angustifolia* Haw. (Asparagales: Asparagaceae)

Héctor Luna-Vicente<sup>1</sup> , Omegar Cruz-Arvizu<sup>2\*</sup> , Sandra L. Castro-Garibay<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Instituto de Horticultura, km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Texcoco, Estado de México, México, 56230.

<sup>2</sup>Colegio de Postgraduados, Postgrado en Fruticultura, Campus Montecillo, km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, 56264

<sup>3</sup>Colegio de Postgraduados, Postgrado en Fisiología Vegetal, Campus Montecillo, km. 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, 56264

\*Autor para correspondencia: omegar.cruz@gmail.com

## RESUMEN

Debido a la demanda de planta de agave para la producción de mezcal, es necesario el uso de herramientas biotecnológicas para producir planta de calidad, por lo que el cultivo *in vitro* es una opción para utilizarse. El objetivo del trabajo fue determinar el tipo de auxina y la concentración para el enraizamiento de *Agave angustifolia* Haw., y la metodología de aclimatización *ex vitro*. Se establecieron 24 plantas de 8 cm en medio líquido con diversas auxinas: ácido 1-naftalenacético (ANA), ácido indol-3-butírico (AIB) y ácido indol-3-acético (AIA) en concentraciones de 0, 0.3, 0.6 y 0.9 mg L<sup>-1</sup>. Una semana después, 12 plantas se colocaron en medio semi-sólido sin auxinas y el resto se mantuvo en medio líquido. Con los brotes que se establecieron en medio de cultivo con ANA se obtuvo el 67-100% de enraizamiento. Las plantas con mayor Número de Raíces (NR) y Longitud de Raíz (LR), fueron las establecidas en medio semi-sólido con rango de 1.87-13.75 y para medio líquido con 0.27-0.61 cm, respectivamente. Se determinó que con ANA se obtienen los mejores resultados para NR y LR. Con la metodología de aclimatización, la sobrevivencia de las plantas fue superior a 90 %.

## PALABRAS CLAVE

Aclimatización, ácido 1-naftalenacético, auxinas

## ABSTRACT

Due to the demand for agave plants for mezcal production, biotechnological tools are necessary for quality plant production, and *in vitro* cultivation is one option that can be used. The objective of this study was to determine the type and concentration of auxin for the rooting of *Agave angustifolia* Haw. shoots and to establish an *ex vitro* acclimatization methodology. Twenty-four plants were established in a liquid medium; the auxins used were 1-naphthaleneacetic acid (ANA), indole-3-butyric acid (IBA), and indole-3-acetic acid (IAA) at concentrations of 0, 0.3, 0.6, and 0.9 mg L<sup>-1</sup>. One week later, 12 plants were placed in a semi-solid medium without auxins, and the rest were kept in the liquid medium. The shoots established in the culture medium with ANA achieved 67-100% rooting. Plants with a higher Root Number (RN) and Root Length (RL) were established in the semi-solid medium, with a range of 1.87 to 13.75 for RN, and in the liquid medium, 0.27 to 0.61 cm for RL. It was determined that the best results for RN and RL were obtained with ANA. With the acclimatization methodology, the survival of the plants was greater than 90%.

## KEYWORDS

Acclimatization, 1-naphthaleneacetic acid, auxins

### Fecha de recepción:

17 de marzo de 2024

### Fecha de aceptación:

5 de julio de 2024

### Disponible en línea:

19 de febrero de 2025

Este es un artículo en acceso abierto que se distribuye de acuerdo a los términos de la licencia Creative Commons.



### Reconocimiento-

NoComercial-

CompartirIgual 4.0

Internacional

(CC BY-NC-SA 4.0)

## INTRODUCCIÓN

*Agave angustifolia* Haw. (Asparagales: Asparagaceae) es una especie endémica de México, con la que se producen bebidas destiladas como mezcal en nueve entidades y bacanora en Sonora; ambas bebidas cuentan con denominación de origen (Fragoso-Gadea et al., 2021). Los estados de Guerrero y Oaxaca son productores importantes de mezcal, en donde, durante 2023 se produjeron más de 12 millones de litros de mezcal (Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal, s.f.), utilizando principalmente las especies de *A. angustifolia* y *A. cupreata* Trel. & A. Berger (Huerta-Zavala et al., 2019).

Actualmente se utilizan diferentes técnicas para la producción de plantas de agave, una de estas es el cultivo *in vitro*, para *A. angustifolia* existen varios reportes donde se mencionan aspectos de proliferación de brotes, enraizamiento y aspectos bioquímicos (Enríquez del Valle et al., 2005; Sánchez-Teyer et al., 2009; Us-Camas et al., 2017).

En cultivo *in vitro* el medio más utilizado para cualquier etapa (establecimiento, multiplicación, enraizamiento) es el compuesto por sales MS (Murashige y Skoog, 1962) el cual fue formulado para proliferación de callo en tabaco. Los reguladores de crecimiento son pieza fundamental para esta técnica, entre los más utilizados se mencionan las citocininas y auxinas, la concentración a utilizarse dependerá del objetivo que se persigue (Miguel et al., 2013).

Entre las citocininas más utilizadas en cultivo *in vitro* de agave se encuentra la 6-benciladenina (BA), además que es con la que mayor cantidad de brotes se ha obtenido; sin embargo se han evaluado también 6- $\gamma$ , $\gamma$ -dimetilalilaminopurina (2iP), kinetina, tidiazurón (TDZ) y meta-topolina (N<sup>6</sup>-(metahidroxibencil-adenina) (Domínguez et al., 2008). En *A. angustifolia* se ha utilizado ácido indol-3-butírico (AIB) (Enríquez del Valle et al., 2005), y ácido indol-3-acético (AIA) en combinación con ácido 1-naftalenacético (ANA) (Ramírez-Mosqueda et al., 2022), ya que estos reguladores de crecimiento están involucrados en procesos de división, elongación y diferenciación celular (Garay-Arroyo et al., 2014).

La auxina más utilizada para enraizamiento de brotes en cultivo *in vitro*, así como enraizado de estacas en vivero, es el AIB, probablemente por las características químicas que tiene, sin embargo, es necesario

comparar al AIB con otras auxinas, tales como ácido indolacético (AIA) y ácido naftalenacético (ANA), para determinar con cuál se obtienen mejores resultados; por lo que el objetivo de esta investigación fue determinar tipo y concentración de auxina para el enraizamiento de brotes de *A. angustifolia* en condiciones *in vitro*, además de definir la metodología para la aclimatización *ex vitro* de las plantas obtenidas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron 240 explantes de *A. angustifolia* de 8 cm de longitud aproximadamente, producidos en condiciones *in vitro*. Se preparó el medio de cultivo líquido base (Cuadro 1), que se dividió en 10 partes, que corresponden a las tres auxinas (ácido indol-3-butírico (AIB), ácido 1-naftalenacético (ANA) y ácido indol-3-acético (AIA), tres concentraciones (0.3, 0.6 y 0.9 mg L<sup>-1</sup>) y el testigo, cada una con 24 tubos de ensayo conteniendo 3 mL del medio.

**Cuadro 1. Medio de cultivo líquido utilizado en el enraizamiento *in vitro* de *Agave angustifolia*.**

Componente	Concentración
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	5 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.0 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.4 mM
Quelatos <sup>†</sup>	0.1 mM
Thiamina <sup>††</sup>	0.1 mM
Myoinositol <sup>††</sup>	0.1 mM
Sacarosa	20 g

Quelatos<sup>†</sup>: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (695 mg) y Na EDTA (931 mg), preparado en 250 mL de agua deionizada. <sup>††</sup> 10 mg de reactivo, en 100 mL de agua deionizada. Todos los reactivos fueron marca Sigma®. Las concentraciones (0.3, 0.6 y 0.9 mg L<sup>-1</sup>) y tipos de auxinas utilizadas (AIA, ANA y AIB) fueron adicionadas al medio, posterior a la preparación. Para el medio semisólido se usaron 6 g L<sup>-1</sup> de agar Sigma®.

Para la segunda fase, los explantes se mantuvieron por una semana en medio líquido con auxinas, después de este tiempo, 12 explantes de cada tratamiento se transfirieron a medio semisólido (10 mL en cada tubo de ensayo) sin auxinas (Cuadro 1) adicionando 6 g de agar Sigma®, y el resto se mantuvieron en el medio líquido. Debido a la transferencia de los brotes a medio semisólido, el total de tratamiento fueron 20,

en los párrafos posteriores se explica a detalle. A los medios de cultivo realizados, se les ajustó el pH a 5.7 y posterior se esterilizó en autoclave a 21 libras por 15 minutos.

### Trasplante y aclimatización *ex vitro*

Las plantas (brotes enraizados – Figura 1A y 1B) se colocaron en maceta de 500 mL con sustrato compuesto por corteza de pino, tezontle y lombricomposta (Figura 1C) con proporciones de 60: 30: 10 v: v: v; colocadas en bolsa de plástico (20×30 cm) y anudándola con una liga (Figura 1D y 1E). El proceso de retiro de la bolsa se inició dos semanas después de observar que hubiese crecimiento de hojas nuevas, dejando la bolsa parcialmente abierta para propiciar la pérdida de humedad (Figura 1F), para la semana tres la bolsa se dejó totalmente abierta y en la cuarta semana la maceta se sacó de la bolsa.

### Diseño experimental y variables evaluadas

El diseño experimental utilizado respecto a enraizamiento *in vitro* fue completamente al azar con arreglo factorial: dos tipos de medio (líquido y semisólido) y un testigo por cada medio, tres auxinas (AIA, AIB, ANA) y concentraciones (0.3, 0.6 y 0.9 mg L<sup>-1</sup>), 20 tratamientos en total. Las variables evaluadas fueron porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raíces.

Con respecto a la aclimatización *ex vitro*, solo se determinó porcentaje promedio de sobrevivencia, además de aspectos cualitativos. No se hicieron análisis estadísticos. Debido a que no se obtuvieron gran cantidad de plantas enraizadas en los medios de cultivo con AIA y AIB, los análisis estadísticos se realizaron solo para ANA y los testigos, en total 8 tratamientos, con el mismo diseño experimental.

El porcentaje de enraizamiento se reportó para todas las combinaciones usadas. Solo se realizó com-



Figura 1. Proceso de trasplante de agave enraizado *in vitro* y aclimatización de las plantas. A) enraizamiento *in vitro* y B) evaluación en plantas de agave, C) trasplante de agaves enraizados, D y E) proceso de aclimatización y F) planta enraizada en sustrato.

paración de medias (Tukey  $p \leq 0.05$ ) para longitud de raíces y el número de raíces se analizó con regresión Poisson. La unidad experimental fue un brote y se tuvieron 12 repeticiones por tratamiento por medio de cultivo para enraizamiento (líquido y semisólido), para el análisis estadístico se usaron 8 plantas (unidades experimentales) por tratamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los brotes formaron raíces al establecerlos en la mayoría de medios de cultivo que variaron en tipos y concentraciones de auxinas, con excepción en  $0.9 \text{ mg L}^{-1}$  de AIB en medio líquido; de manera general, en el medio de cultivo semisólido se presentaron más plantas enraizadas. Respecto al tipo de auxina, el porcentaje promedio de enraizamiento fue 77, 47 y 34 % para ANA, AIB y AIA, respectivamente (Figura 2).

Para enraizar plantas de manera convencional e *in vitro*, la auxina más utilizada es AIB debido a que la molécula se oxida de manera lenta dentro de las plantas, dando mayor tiempo de acción en compa-

ración con AIA (Hernández et al., 2005). Para varias especies de agave como: *A. angustifolia* (Enríquez del Valle et al., 2005), *A. kewensis* Jacobi (Santíz et al., 2012), *A. potatorum* Zucc. (Bautista-Castellanos et al., 2020), se reporta el uso de AIB para inducir enraizamiento con resultados superiores a 90 %. Sin embargo, en el presente trabajo se determinó que con ANA hay más enraizamiento, a diferencia de AIA y AIB, lo cual denota que el tipo de auxina está en función de la especie de agave.

La mayor cantidad de plantas enraizadas se obtuvo en el medio semisólido, en el cual fueron transferidos los agaves una semana después de haber permanecido en los tratamientos con auxina (tipo y concentraciones). Se demuestra que *A. angustifolia* disminuye el porcentaje de enraizamiento, número y longitud de raíces, cuando se mantiene en contacto prolongado con los tipos y concentraciones de auxinas utilizados en el presente trabajo. Tien et al. (2020) mencionan que altas concentraciones de auxina pueden inducir toxicidad durante el proceso de enraizamiento, lo cual puede haber sucedido con los brotes de *A. angustifolia* al estar en contacto prolongando con los tratamientos.

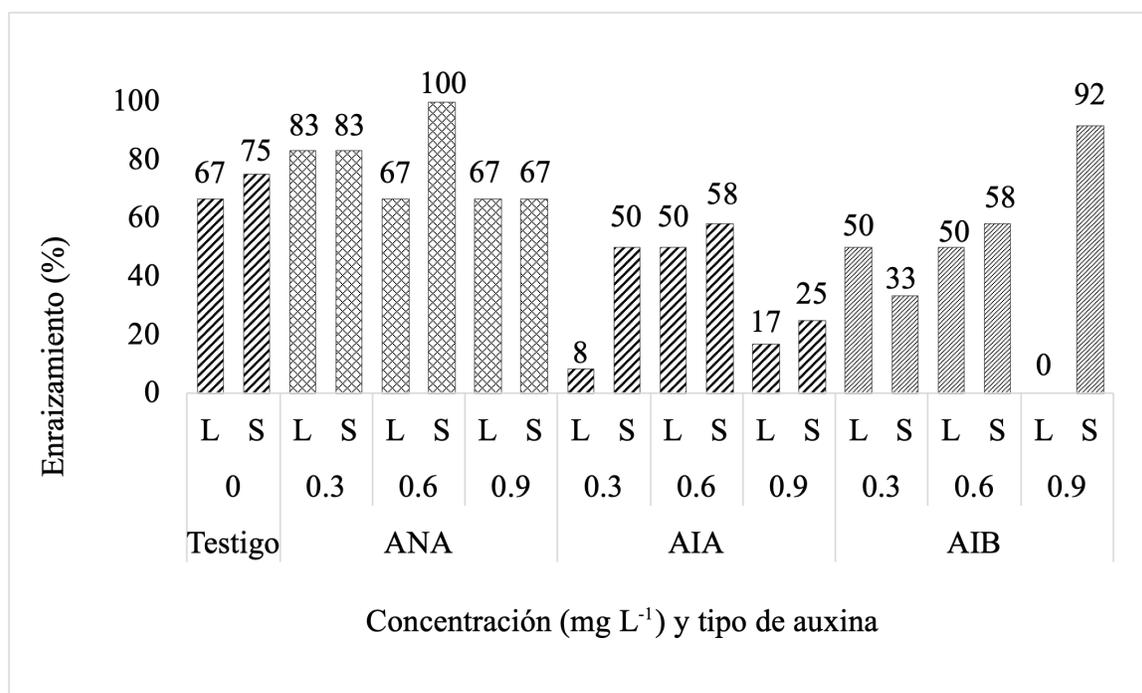


Figura 2. Porcentaje de brotes enraizados de *A. angustifolia* que formaron raíces *in vitro*. n = 12; L: medio líquido; S: medio semisólido; ANA: ácido naftalenacético; AIA: ácido indolacético; AIB: ácido indolbutírico; concentraciones: 0, 0.3, 0.6, y  $0.9 \text{ mg L}^{-1}$

En el medio líquido con auxinas, el rango de enraizamiento fue 0 – 83 %, mientras que en el semisólido varió de 25 – 100 % (Figura 2). Park et al. (2017) mencionan que la exposición a altas concentraciones de auxina reduce la eficiencia en enraizamiento, además de inducir formación de callo. Probablemente esta fue la razón por la cual los brotes en medio líquido con los tipos y concentraciones de auxinas presentaron menores porcentajes de enraizamiento a diferencia de los brotes en medio semisólido.

El proceso de enraizamiento en agave inició a los 11 y 18 días después de colocar el experimento, en el medio líquido y semisólido, respectivamente. De acuerdo con el tipo de auxina, el enraizamiento inició en AIA, seguido de ANA, AIB y por último el tratamiento testigo; pero hubo más enraizamiento con ANA; esto puede estar asociado a la preferencia de la planta por el tipo de auxina, además del grado de estabilidad de ésta en el medio de cultivo. Dunlap et al. (1986) mencionan que 75 % de AIB no presenta alteraciones después de 30 días en oscuridad, pero en condiciones de luz, solo el 40 % de este compuesto puede utilizarse, AIA es la auxina más inestable, y ANA no presenta problemas de oxidación.

Debido a que las unidades experimentales no fueron suficientes para AIA y AIB, solo se realizó análisis de varianza y comparación de medias para los resultados de ANA (Cuadro 2). El número de raíces en medio líquido varió de 2.25-8.62 y en el semisólido 1.87-13.75, aunque no se observó diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ). Los testigos presentaron resultados menores tanto en número de raíces (1.87-2.25) y longitud de raíces (0.52-0.61 cm) (Cuadro 2). Por otro lado,

de acuerdo con el análisis de varianza, la longitud de raíces no presentó diferencias estadísticas.

En el caso de AIA el número de raíces fue de 1-7 para ambos medios, y la longitud promedio varió de 0.52 y 0.26 cm para las plantas en medio líquido y semisólido, respectivamente. Para AIB, el número de raíces fue de 1-11 y 1-7, y la longitud de 0.26 y 0.27 cm en medio líquido y semisólido, respectivamente (Datos no mostrados).

Al comparar la cantidad de medio de cultivo utilizada (semisólido: 10 mL y líquido: 3 mL), al usar la segunda opción se ahorran reactivos y agua; además de tener la facilidad de oxigenar el medio, y al momento del trasplante en sustrato se disminuye la proliferación de hongos al no llevar restos de agar. Los componentes del medio semisólido sin auxina pueden utilizarse de forma líquida, disminuyendo el costo de la técnica *in vitro*.

El uso de medio semisólido es generalizado para muchas especies propagadas mediante cultivo *in vitro*, se mencionan que las ventajas del medio líquido son: mayor rango de difusión de nutrientes y reguladores de crecimiento, reducción de estrés oxidativo, oxigenación del medio, mayor tasa de crecimiento y multiplicación, fácil elaboración del medio (Albany et al., 2015; Shukla et al., 2020); pero también se aumenta el riesgo por asfixia e hiperhidratación (Lyam et al., 2012), en el caso de *A. angustifolia* no se observó hiperhidratación en medio líquido.

Un error que se comete de manera general durante el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro*, es el crecimiento excesivo de las raíces, como lo reporta Silos-Espino et al. (2007) para *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck con

**Cuadro 2. Características en raíces de *Agave angustifolia* Haw, cultivadas *in vitro* con concentraciones de ácido naftalenacético (ANA).**

Medio	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	NR	LR (cm)
Líquido	0	2.25±0.31b	0.61±0.12a
Semisólido		1.87±0.39b	0.52±0.10a
Líquido	0.3	6.37±1.11ab	0.27±0.02a
Semisólido		12.25±1.96a	0.49±0.11a
Líquido	0.6	7.87±2.15ab	0.27±0.04a
Semisólido		13.75±1.93a	0.28±0.03a
Líquido	0.9	8.62±1.87ab	0.28±0.03a
Semisólido		12.65±4.19a	0.40±0.12a

raíces de hasta 16 cm. El crecimiento tan largo de raíces implica gasto de energía para la planta, las cuales son podadas porque no caben en la maceta o pueden crecer enrolladas; por tal razón en el presente trabajo las raíces se evaluaron tres días después de emitidas, para no hacer podas y facilitar el trasplante en macetas (Figura 1B).

### Aclimatización *ex vitro*

Para determinar los tiempos del proceso de aclimatización se realizaron ensayos previos, donde se observó que las plantas obtenidas *in vitro* se pudren por exceso de humedad cuando el proceso de apertura de la bolsa se inicia de 3 a 4 semanas después de iniciar el proceso de aclimatización *ex vitro*. Por lo que se optó por abrir las bolsas de plástico una semana después de trasplantar las plantas obteniendo mejores resultados de sobrevivencia, tomando como criterio la aparición de al menos una hoja nueva. De esta manera se determinó que entre las semanas 1 y 2 es el tiempo apto para iniciar con la aclimatización de las plantas obtenidas *in vitro*.

Cabe mencionar que se logró enraizar 113 brotes, con la metodología de aclimatización presentada con 94 % de sobrevivencia. De las plantas trasplantadas 85 % presentaron una hoja nueva dos semanas después, lo cual puede utilizarse como indicador para el retiro de la bolsa de plástico, y que probablemente la actividad fotosintética se había regulado.

Hazarika (2006) menciona que las plantas propagadas *in vitro* presentan baja eficiencia fotosintética, funcionamiento deficiente de estomas y poca cera epicuticular; por lo que el manejo deficiente durante la etapa de aclimatización puede causar muerte de las plantas. Por otro lado, da Silva y Villegas (2009) mencionan que el medio en que se obtienen las plantas, influye en el proceso de aclimatización, ya que los componentes de este influyen en las reservas almacenadas en los explantes y por ende en el desempeño de las plantas.

Las plantas de agave generalmente se aclimatizan en invernadero con nebulización y riego, donde se alcance humedad relativa de 80-90 % (Yescas et al., 2016). Pero Castro-Garibay et al. (2019) mencionan que a nivel experimental el uso de bolsas de plástico para

aclimatizar plantas, es una opción viable y económica, donde no se necesitan infraestructuras costosas.

### CONCLUSIONES

El ácido naftalenacético es la mejor auxina para inducir el enraizamiento de brotes *in vitro* de *A. angustifolia*. La cantidad y longitud de raíces en *A. angustifolia* disminuye cuando están en contacto prolongado con medio de cultivo con auxinas. Con la propuesta de aclimatización *ex vitro* de plantas de agave producidas *in vitro* se obtiene sobrevivencia de 94 %, la emisión de las nuevas hojas se puede tomar como criterio para determinar que la planta está aclimatada.

### LITERATURA CITADA

- Albany, N. R., Vilchez, J. A., León, S., Nava, A. R., Martínez, L. J., & Molina, M. A. (2015). Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 24-31. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50669>
- Bautista-Castellanos, A. I., Enríquez del Valle, J. R., Velasco-Velasco, V. A., & Rodríguez-Ortiz, G. (2020). Enraizado de brotes *in vitro* y aclimatización de plantas de *Agave potatorum* Zucc. *Ecosistemas y Recursos Pecuarios*, 7(3), e2618. <https://doi.org/10.19136/era.a7n3.2618>
- Castro-Garibay, S. L., Villegas-Monter, A., & Contreras-Maya, R. 2019. Enraizamiento de estacas en tres cultivares de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). *Agroproductividad*, 12(3), 63-68. <https://doi.org/10.32854/agrop.v0i0.1328>
- Consejo Mexicano Regulador de la Calidad del Mezcal (s.f). *Informe estadístico*. Recuperado el 8 de julio de 2024 [https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2024/04/PUBLICO\\_INFORME\\_2024.pdf](https://comercam-dom.org.mx/wp-content/uploads/2024/04/PUBLICO_INFORME_2024.pdf)
- Domínguez, R. M. S., Alpuche, S. A. G., Vasco, M. N. L., & Pérez, M. B. E. (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4), 317-322. <https://doi.org/10.35196/rfm.2008.4.317>
- Dunlap, J. R., Kresovich, S., & McGee, R. E. (1986). The effect of salt concentration on auxin stability in cul-

- ture media. *Plant Physiology*, 81(3), 934-936. <https://doi.org/10.1104/pp.81.3.934>
- Enrriquez del Valle, J. R., Carrillo, C. G., Rodríguez de la O, J. L. (2005). Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 28(2), 175-178.
- Fragoso-Gadea, T., Gutiérrez, A., Coronado, M. L., Terrazas, T., Ramos-Clamont, G., Vázquez-Moreno, L., Álvarez-Bajo, O., & Esqueda, M. (2021). Poblaciones silvestres de *Agave angustifolia* (Asparagaceae) de Sonora, México: variación morfológica y contenido de azúcares. *Acta Botánica Mexicana*, 128, e1889. <https://doi.org/10.21829/abm128.2021.1889>
- Garay-Arroyo, A., Sánchez, M. P., García-Ponce, B., Álvarez-Buylla, E. R., & Gutiérrez, C. 2014. La homeostasis de las auxinas y su importancia en el desarrollo de *Arabidopsis thaliana*. *REB*, 33(1), 13-22.
- Hazarika, B. N. (2006). Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108(2), 105-120. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.01.038>
- Hernández, J. R., Aramendiz, H., & Cardona, C. E. (2005). Influencia del ácido indolbutírico y ácido naftalenoacético sobre el enraizamiento de esquejes de caña flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.). *Temas Agrarios*, 10(1), 5-13. <https://doi.org/10.21897/rta.v10i1.626>
- Huerta-Zavala, J., Sabino-López, J., Ochoa-Miranda, R., Damián-Nava, A., Segura-Pacheco, H., & Hernández-Castro, E. (2019). Áreas potenciales de *Agave angustifolia* Haw en Guerrero, México. *Agro Productividad*, 12(9), 3-9. <https://doi.org/10.32854/agrop.v12i9.1420>
- Lyam, P. T., Musa, M. L., Jamaledine, Z. O., Okere, U. A., & Odofin, W. T. (2012). The potential of Temporary Immersion Bioreactors (TIBs) in meeting crop production demand in Nigeria. *Journal of Biology and Life Science*, 3(1), 67-86. <https://doi.org/10.5296/jbls.v3i1.1156>
- Miguel, M. E., Enrriquez-del Valle, J. R., Velasco, V. A., Villegas, Y., Carrillo, J. C., & Rodríguez, G. (2013). Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de *Agave*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, Pub. Esp.* 6, 1151-1159.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Park, S.-H., Elhiti, M., Wang, H., Xu, A., Brown, D., & Wang, A. (2017). Adventitious root formation of *in vitro* peach shoots is regulated by auxin and ethylene. *Scientia Horticulturae*, 226, 250-260. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.053>
- da Silva, R. P., & Villegas, Á. (2009). Niveles de sacarosa en el enraizamiento *in vitro* y aclimatización *ex vitro* de plántulas del portainjerto de vid R110 (*Vitis rupestris* × *Vitis berlandieri*). *Interciencia*, 34(12), 897-902.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Cárcamo-Coronal, R. G., Aguilar-Jiménez, D., & Bello-Bello, J. J. (2022). Micropopagation of *Agave* (*Agave potatorum* Zucc.) through direct organogenesis. *Agrociencia*, 56(6), 1-11. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v56i6.2823>
- Sánchez-Teyer, F., Moreno-Salazar, S., Esqueda, M., Barraza, A., & Robert, M. L. (2009). Genetic variability of wild *Agave angustifolia* populations based on AFLP: A basic study for conservation. *Journal of Arid Environments*, 73(6-7), 611-616. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2009.01.008>
- Santíz-Gómez, J. A., Rincón, R., & Gutiérrez-Miceli, F. (2012). Propagación in vitro de *Agave grijalvensis* B. Ullrich una especie endémica de Chiapas bajo protección especial. *Gayana Botanica*, 69, 23-30.
- Shukla, M. R., Piunno, K., Saxena, P. K., & Jones, A. M. P. (2020). Improved in vitro rooting in liquid culture using a two-piece scaffold system. *Engineering in Life Science*, 20(3-4), 126-132. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900133>
- Silos-Espino, G., González-Cortés, N., Carrillo-López, A., Guevaralara, F., Valverde-González, M. E., & Paredes-López, O. (2007). Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* 'Gentry'. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(3), 355-359. <https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512242>
- Tien, L. H., Chac, L. D., Oanh, L., Ly, P. T., Sau, H. T., Hung, N., Thanh, V. Q., Doudkin, R. V., & Thinh, B. B. (2020). Effect of auxins (IAA, IBA, and NAA) on clonal propagation of *Solanum procumbens* stem cuttings. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 21(55-56), 113-120.
- Us-Camas, R., Castillo-Castro, E., Aguilar-Espinosa, M., Limones-Briones, V., Rivera-Madrid, R., Robert-Díaz, M. L., & De-la-Peña, C. (2017). Assessment of molecular and epigenetic changes in the albinism of *Agave angustifolia* Haw. *Plant Science*, 263, 156-167. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.07.010>
- Yescas, E., Campos, G. V., Enrriquez del Valle, J. R., Velasco, V. A., Rodríguez, G., & Ruíz, J. (2016). Aclimatación de *Agave americana* var. *Oaxacensis* obtenidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(4), 911-922.