

## Enraizado de brotes *in vitro* y aclimatación de plantas de *Agave potatorum* Zucc.

### *In vitro* rooting of shoots and acclimatization of *Agave potatorum* Zucc. plants

Ariadna Ivón Bautista-Castellanos<sup>1</sup> ,  
José Raymundo Enríquez-del Valle<sup>1</sup> ,  
Vicente Arturo Velasco-Velasco<sup>1</sup> ,  
Gerardo Rodríguez-Ortiz<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Tecnológico Nacional de México, Campus Valle de Oaxaca, División de Estudios de Posgrado e Investigación. Domicilio conocido, Ex Hacienda de Nazareno, CP. 71233. Xoxocotlán, Oaxaca, México.

\*Autor de correspondencia: [gerardo.rodriguez@voaxaca.tecnm.mx](mailto:gerardo.rodriguez@voaxaca.tecnm.mx)

#### Artículo científico

Recibido: 10 de junio 2020

Aceptado: 13 de diciembre 2020

Como citar: Bautista-Castellanos AI, Enríquez-del Valle JR, Velasco-Velasco VA, Rodríguez-Ortiz G (2020) Enraizado de brotes *In Vitro* y aclimatación de plantas de *Agave potatorum* Zucc.. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 7(3): e2618. DOI: 10.19136/era.a7n3.2618

**RESUMEN.** *Agave potatorum* Zucc. es una especie monocotiledónea silvestre o cultivada, usada para elaborar mezcal, y por su creciente demanda es colectada de forma excesiva. El objetivo fue conocer el efecto de la concentración de las sales minerales, el ácido indol-acético (AIA) y ácido indol-3-butírico (AIB) en el medio de cultivo, Mc, sobre el enraizado de brotes *in vitro*, la aclimatación y crecimiento de las plantas micropropagadas que en vivero recibieron diferentes dosis de fertilización. El trabajo consistió de dos etapas: 1) brotes cultivados durante 66 días en Mc con concentración diferente de sales inorgánicas MS (75 o 100%), auxina (AIA o AIB) solas o combinadas en concentraciones de 0, 0.1, o 0.5 mg L<sup>-1</sup>. En la etapa 2, grupos de plantas originadas de brotes enraizados se transfirieron a charolas con sustrato 33% turba-66% perlita, y se fertirrigaron durante 90 días con dosis diferente de solución nutritiva, SN (25, 50, o 100%) de la formulación Steiner. Entre 94 y 96% de los brotes formaron raíces en Mc con 0.1 a 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIB, transcurridos 13 a 37 días de incubación, siendo la mejor respuesta que los brotes en Mc sin auxinas, o con AIA. Cuando las plantas estuvieron 90 días en vivero, del 87 a 90% fue adaptada. Las plantas fertirrigadas con SN-50% desarrollaron en promedio 8.9 hojas, con largo máximo de 8.4 cm, el tallo de 10.27 mm de diámetro, peso fresco de 4.15 g y peso seco de la planta de 0.31 g.

**Palabras clave:** Aclimatación, micropropagación, nutrición vegetal, propagación clonal.

**ABSTRACT.** *Agave potatorum* Zucc., is a wild or cultivated monocotyledonous species, used to make mezcal, and due to its growing demand it is collected excessively. The objective was to know the effect of the concentration of mineral salts, indole-acetic acid (IAA) and indole-3-butyric acid (IBA) in the culture medium, Mc, on the *in vitro* rooting of shoots, the acclimatization and growth of the micropropagated plants that received different doses of fertilization in the nursery. The work consisted of two stages: 1) shoots grown for 66 days in Mc with different concentration of inorganic salts MS (75 or 100%), auxin (IAA or IBA) alone or combined in concentrations of 0, 0.1, or 0.5 mg L<sup>-1</sup>. In stage 2, groups of plants originating from rooted shoots were transferred to trays with 33% peat-66% perlite substrate, and were fertirrigated for 90 days with different doses of nutrient solution, SN (25, 50, or 100%) of the Steiner formulation. Between 94 and 96% of the shoots formed roots in Mc with 0.1 to 0.5 mg L<sup>-1</sup> of IBA, after 13 to 37 days of incubation, the better response than the shoots in Mc without auxins, or with IAA. When the plants were 90 days in the nursery, from 87 to 90% were adapted. The plants fertirrigated with SN-50% developed an average of 8.9 leaves, with a maximum length of 8.4 cm, the stem of 10.27 mm in diameter, fresh weight of 4.15 g and dryweight of the plant of 0.31 g.

**Key words:** Acclimatization, clonal propagation, micropropagation, plant nutrition.

## INTRODUCCIÓN

Los habitantes de México han usado las especies del género *Agave* durante al menos 30 siglos, y en diversas regiones son elementos importantes de la cultura y la actividad económica (Colunga *et al.* 2007). *Agave potatorum* es una especie silvestre o cultivada en extensiones pequeñas, es apreciada como materia prima para elaborar la bebida llamada mezcal, y por su creciente aprovechamiento sin aplicar programas de manejo, sus poblaciones están disminuyendo (Aguirre-Dugua y Eguiarte 2013). Por lo que, desde la década de 1990's grupos de agricultores de la sierra sur del estado de Oaxaca han implementado la propagación de *A. potatorum* mediante la germinación de semillas, desarrollo en vivero y establecimiento en pequeñas plantaciones (Enríquez-del Valle 2008). Pero se requiere incrementar la cantidad de plantas que se producen, por lo que se deben implementar acciones para lograr la conservación de los agaves mediante la colecta de germoplasma, propagación y establecimiento de plantaciones (Pérez-Molphe *et al.* 2012, Enríquez-del Valle *et al.* 2016a, 2016b). Una de las alternativas para producir mayor cantidad de plantas, es la propagación *in vitro* que se debe complementar con acciones de selección de las plantas a propagar, el desarrollo del protocolo de propagación de acuerdo a la especie, en las etapas de laboratorio, invernadero, adaptación y vivero, para producir plantas de calidad sanitaria y fisiológica (Monja-Mio *et al.* 2015).

El proceso de propagación *in vitro* incluye el establecimiento de cultivos asépticos, la multiplicación de propágulos, el enraizado de brotes en preparación para trasplante al suelo y la transferencia de las plantas micropropagadas a contenedores con sustrato para su aclimatación en invernadero. Para que los brotes formen raíces se establecen en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento (RC) o bien que contengan RC de tipo auxina, como el ácido indol-acético (AIA), el ácido naftalenacético (ANA) y ácido Indol-3-butírico (AIB), las cuales inducen que algunas células en el tejido del tallo asuman divisiones celulares, y formen centros meristemáticos que originen la emergencia y desarrollo de raíces

adventicias (Woodward y Bartel 2005). Para el enraizado *in vitro* de brotes de *A. angustifolia*, se ha reportado que el 90% de brotes forman raíces en medios de cultivo con las sales minerales al 100% y sin auxinas, pero en medios al 75% de sales y 0.75 mg L<sup>-1</sup> de AIB los brotes formaron mayor cantidad de raíces y en menor tiempo (Enríquez-del Valle *et al.* 2005). En la micropropagación de *Agave marmorata*, los brotes formaron raíces al establecerlos en medio de cultivo con las sales minerales al 100% y 10 mg L<sup>-1</sup> de la auxina AIA, y las plantas micropropagadas se establecieron durante tres semanas en ambiente de invernadero y contenedores con sustratos a base de turba de musgo, perlita y arena de río, se tuvo 100% de sobrevivencia (Aguilar-Jiménez y Rodríguez-de la O 2018). Pero cada especie de agave tiene diferente efecto a las sales minerales y auxinas durante el enraizado de brotes, por lo que se requiere establecer la composición de los medios de cultivo para cada especie.

Las plantas micropropagadas presentan ineficiente funcionamiento de sus estomas, baja actividad fotosintética, escasa formación de cutícula de las hojas; además, las raíces deben aumentar su eficiencia y conexión con los haces conductores del tallo (Chandra *et al.* 2010). Las plantas con estas características tienen limitada capacidad para su establecimiento en vivero o campo, en donde impera menor humedad relativa, variaciones de temperatura en rangos más amplios, irradiación alta (hasta 2 000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), y limitado abastecimiento de nutrientes, por lo que dependiendo de la especie las plantas se establecen durante 30 a 90 días en contenedores con sustrato de densidad aparente baja, 0.11 a 0.5 g cm<sup>-2</sup>, que retenga humedad, pero drene el exceso de agua para tener porosidad de aireación entre el 33 y 77% (Blok y Wever 2008). Por lo que al ponerlas en invernadero se proporciona inicialmente humedad relativa alta, radiación solar disminuida 30-50% mediante sombra, condiciones necesarias para que en las plantas ocurran cambios morfológicos y fisiológicos, y aumente su capacidad de aclimatación en campo (Deb e Imchen 2010, Lesar 2012, Alvarez *et al.* 2012). Se tienen registros de plantas de agaves que han sido aclimatadas con éxito en donde se ha

demostrado además, la importancia de las características del sustrato y el abastecimiento nutrimental con la aplicación de la solución Steiner en: *A. angustifolia* (Enríquez-del Valle *et al.* 2012, Monja-Mio *et al.* 2015), *A. potatorum*, *A. americana* var. *oaxacensis* (Enríquez-del Valle *et al.* 2013, Cruz-García *et al.* 2017). Por lo mencionado anteriormente el objetivo del presente trabajo fue evaluar el enraizado de brotes establecidos en medios de cultivo con concentraciones diferentes de sales minerales y auxinas, así mismo evaluar la aplicación de las dosis diferentes de solución nutritiva Steiner en la aclimatación en vivero de las plantas micropropagadas de *A. potatorum* Zucc.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención del material vegetal

El experimento se realizó en el Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca, México, ubicado a 17° 04' LN, 96° 46' LO con altitud de 1 550 m. Como material vegetal se utilizaron plántulas a partir de semillas germinadas *in vitro*. Las semillas se colectaron de plantas silvestres de *A. potatorum* Zucc, en San Pedro Totolapan, Distrito de Tlacolula, Oaxaca, México. De las plantas se separaron tejidos foliares y de tallo que se establecieron en medio de cultivo para inducir la formación y proliferación de brotes adventicios, mediante el procedimiento descrito por Luna-Luna *et al.* (2017). Para luego realizar el enraizado de brotes y la aclimatación de plantas micropropagadas.

### Enraizado de brotes

Se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales, para lo cual se tomaron de los recipientes de cultivo, racimos con 15 a 23 brotes de tamaño heterogéneo en la etapa de proliferación de propágulos, de los cuales se seleccionaron brotes de 4 a 5.5 cm de altura, los cuales se separaron individualmente para luego transferir tres brotes en cada frasco de 8.5 cm de altura, 5.4 cm de diámetro interno y 160 cm<sup>3</sup> con 20 mL de medio de cultivo para inducir la formación de raíces adventicias. Se prepararon 18 variantes de medio de cultivo que tenían 100 mg L<sup>-1</sup>

de myo-inositol, 1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 25 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, que variaron en: 1) sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962) en concentraciones de 75 o 100%; 2) concentraciones de 0, 0.1 y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-acético (AIA) ,y 3) concentraciones de 0, 0.1 y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico (AIB). En todas las variantes de medio de cultivo, el pH se ajustó a 5.8 antes de agregar 5.7 g L<sup>-1</sup> de agar. Los brotes establecidos se incubaron por 66 días en condiciones de iluminación LED, 35 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, en fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad, con temperatura entre 15 y 29 °C.

El experimento se estableció bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2×3×3 (dos niveles de concentraciones de sales minerales, tres niveles de concentraciones de AIA y tres niveles de concentraciones de AIB), por lo que se tuvieron 18 tratamientos, tomando como unidad experimental un frasco con tres brotes, con ocho repeticiones por tratamiento, y cuando transcurrieron 66 días de incubación, se evaluó el porcentaje de brotes que formaron raíces adventicias. El desarrollo de la parte aérea y raíces, se determinó en una planta tomada al azar de cada frasco, cuantificando el número de hojas, la longitud de la hoja más larga, número de brotes, diámetro del tallo, número de raíces, longitud de la raíz más larga, volumen de raíz, peso fresco y peso seco.

### Aclimatación de plantas micropropagadas

De cultivos *in vitro* en la etapa de multiplicación de propágulos, se obtuvieron 300 brotes de 4 a 4.5 cm de altura, y se transfirieron tres brotes en cada frasco de 160 cm<sup>3</sup>, con 20 mL de medio de cultivo para enraizado de brotes, preparado con las sales minerales MS al 100% de concentración, 100 mg L<sup>-1</sup> de myo-inositol, 1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl, 25 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indol-3-butírico (AIB). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8 antes de agregar 5.7 g de agar L<sup>-1</sup>. Los cultivos *in vitro* se incubaron durante 66 días en condiciones similares que durante el experimento de enraizado de brotes, y transcurrido este periodo se obtuvieron las plantas micropropagadas que se extrajeron de los frascos y se lavaron para retirar el residuo del medio de

cultivo. Entonces se seleccionaron 201 plantas homogéneas en tamaño, que se transfirieron a charolas de 26 cm de ancho, 53 cm de longitud y 6.5 cm de altura, divididas en 50 cavidades de 90 cm<sup>3</sup> con sustrato turba-perlita (1:2). Para posteriormente establecerlas durante 60 días en una casa sombra de aclimatación, expuestas a humedad relativa entre 80 y 90%, y radiación solar de 400 a 500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las plantas recibieron todos los días riego intermitente por nebulización de 10 s cada 12 minutos, en horario de 11:00 a 16:00 h. Las 201 plantas se separaron en tres grupos de 67 plantas, para aplicarles diluciones diferentes (25, 50 y 100%) de solución nutritiva de Steiner (1984). Se aplicaron 20 mL de fertirriego a nivel de sustrato, después del periodo de nebulización, tres veces por semana, durante 60 días. Cuando transcurrieron los primeros 60 días de aclimatación, se trasladaron a vivero donde se expusieron durante los días 61 a 90 a radiación solar de 600 a 700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , bajo cubierta de malla sombra, ventilación y humedad relativa entre 40 y 60%. Las plantas ya no recibieron riego por nebulización, pero se fertirrigaron tres veces por semana con la correspondiente dilución de solución nutritiva.

A los 30 y 90 días de aplicación de la solución nutritiva, de cada grupo de 67 de plantas, se eligieron 10 plantas a las que se les cuantificó el número de hojas (NH), la longitud y ancho de la hoja más grande, diámetro del tallo, y en el día 90 se cuantificó además, el peso fresco y seco de la parte aérea y raíz. La unidad experimental fue una planta y por tratamiento se tuvieron 10 repeticiones. De las 67 plantas en cada tratamiento se determinó el porcentaje de plantas adaptadas. El experimento se estableció de acuerdo a un diseño completamente al azar.

### Análisis estadístico

En el experimento 1, los datos de cada una de 10 variables se les aplicaron las pruebas de Bartlett y Shapiro-Wilk, de homogeneidad y normalidad de varianzas, respectivamente. Los datos que no cumplieron con estos supuestos se transformaron de la forma siguiente: número de hojas (raíz cuadrada en combinación con logaritmo natural), número de

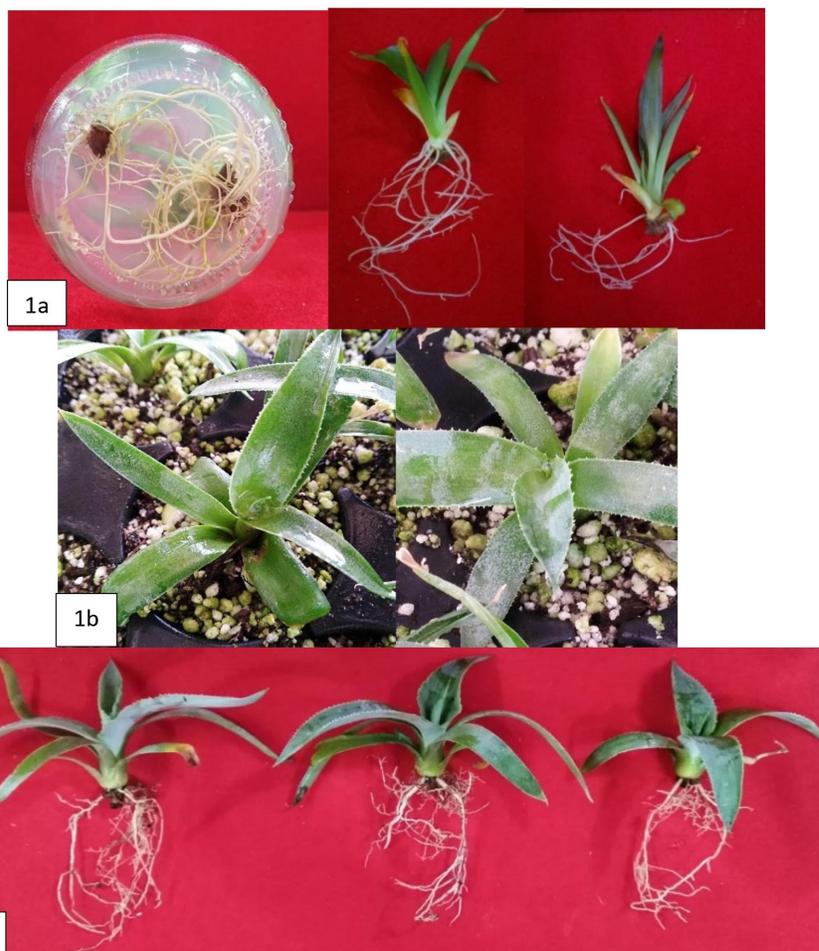
brotos (raíz cuadrada con logaritmo decimal), longitud de raíz (arco seno con tangente) y volumen de raíz (logaritmo natural con raíz cuadrada) para cumplir con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Mientras que el resto de variables no se transformaron. Para luego realizar el análisis de varianza y las comparaciones de medias (Tukey, 0.05). Se realizaron contrastes ortogonales para comparar los efectos en el enraizado de brotes: cuando los brotes se establecieron en medios de cultivo con o sin auxinas; comparar los efectos del uso combinado de AIB+AIA contra el uso de un solo tipo de auxina; el uso de AIB contra el uso de AIA; la comparación entre concentraciones de auxinas. Los datos del experimento 2, a los 30 y 90 días de aclimatación se sometieron a análisis de varianza y comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey (0.05). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistical Analysis System (SAS) versión 9.0.

## RESULTADOS

### Enraizado de brotes

Los datos mostraron diferencias en la cantidad de brotes de *A. potatorum* que formaron raíces adventicias, en el crecimiento de la raíz y parte aérea, en respuesta a la cantidad de sales inorgánicas, tipo y concentración de auxina en el medio de cultivo. En la base de los brotes las raíces adventicias fueron visibles entre los 13 y 37 días de incubación. Se considera que el *A. potatorum* es una especie de difícil enraizado, pues en el medio de cultivo sin auxinas el 73% de los brotes formó raíces adventicias, además de que requirieron en promedio más tiempo para enraizar, mientras que los brotes en medios de cultivo con AIA o AIB, solos o combinados, entre el 88 y 96% de los brotes formaron raíces en mayor número.

Después de los 66 días de incubación en la etapa de enraizado de brotes (Figura 1a), el análisis de varianza (Tabla 1) indica que las concentraciones del ácido Indol-3-butírico (AIB) tuvieron efecto diferente significativo ( $p \leq 0.05$ ) sobre el peso fresco de la parte aérea, y peso fresco de raíces; además de efecto diferente altamente significativo ( $p \leq 0.01$ )



**Figura 1.** (1a) Plantas obtenidas *in vitro* a partir del enraizado de brotes a los 66 días de incubación, (1b) plantas micropropagadas de 60 días de aclimatación, (1c) plantas de *A. potatorum* fertilizadas con las concentraciones de solución nutritiva a los 90 días de aclimatación en invernadero.

**Tabla 1.** Cuadros medios del análisis de varianza de variables evaluadas en plantas de *Agave potatorum* Zucc, obtenidas en la etapa de enraizado de brotes, en diferentes medios de cultivo a los 66 días.

F.V	GL	Cuadros Medios y Significancia									
		AHL (cm)	NH	NR	LR (cm)	NB	DT (mm)	PFA(g)	PSA(g)	PFR(g)	PSR(g)
AIA	2	1.18 <sup>ns</sup>	0.001 <sup>ns</sup>	3.55 <sup>ns</sup>	0.04 <sup>ns</sup>	0.002 <sup>ns</sup>	0.24 <sup>ns</sup>	0.10 <sup>ns</sup>	0.00 <sup>ns</sup>	0.001 <sup>ns</sup>	0.00 <sup>ns</sup>
AIB	2	1.80 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	33.08**	0.11 <sup>ns</sup>	0.08 <sup>ns</sup>	3.20 <sup>ns</sup>	0.70*	0.014 <sup>ns</sup>	0.009*	0.00**
Smin	1	0.42 <sup>ns</sup>	0.004 <sup>ns</sup>	0.53 <sup>ns</sup>	0.18 <sup>ns</sup>	0.17 <sup>ns</sup>	18.34*	1.66*	0.006 <sup>ns</sup>	0.004 <sup>ns</sup>	0.00 <sup>ns</sup>
AIA*AIB	4	1.57 <sup>ns</sup>	0.003 <sup>ns</sup>	2.70 <sup>ns</sup>	0.45 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	16.68**	0.07 <sup>ns</sup>	0.002 <sup>ns</sup>	0.003 <sup>ns</sup>	0.00 <sup>ns</sup>
AIA*Smin	2	1.86 <sup>ns</sup>	0.00 <sup>ns</sup>	5.49 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	0.12 <sup>ns</sup>	1.62 <sup>ns</sup>	0.08 <sup>ns</sup>	0.005 <sup>ns</sup>	0.001 <sup>ns</sup>	0.00 <sup>ns</sup>
AIB*Smin	2	0.67 <sup>ns</sup>	0.01 <sup>ns</sup>	6.90 <sup>ns</sup>	0.23 <sup>ns</sup>	0.16 <sup>ns</sup>	9.32*	1.20*	0.010 <sup>ns</sup>	0.007*	0.00 <sup>ns</sup>
AIA*AIB*Smin	4	1.06 <sup>ns</sup>	0.00 <sup>ns</sup>	2.97 <sup>ns</sup>	0.15 <sup>ns</sup>	0.09 <sup>ns</sup>	6.16*	0.45 <sup>ns</sup>	0.009 <sup>ns</sup>	0.003 <sup>ns</sup>	0.00 <sup>ns</sup>
Error	126	1.51	0.006	4.04	0.350	0.060	2.15	0.211	0.007	0.002	0.00
Total	143	96.26						96.26			

FV = fuentes de variación; GL = grados de libertad; AIA = ácido Indolacético; AIB = ácido Indolbutírico; Smin = sales minerales; AHL = altura de hoja más larga; NH = número de hojas; NR = número de raíces; LR = longitud de la raíz; NB = número de brotes; DT = diámetro del tallo; PFA = peso fresco parte aérea; PSA = peso seco de la parte aérea; PFR = peso fresco raíz; PSR = peso seco de raíz \* = significativo (p > 0.05); \*\* = altamente significativo (p ≤ 0.01); <sup>ns</sup> = no significativo (p > 0.05).

en el número y peso seco de raíces. Las concentraciones de sales minerales (Smin), tuvieron efectos diferentes significativos ( $p \leq 0.05$ ) en el diámetro del tallo y peso fresco de la parte aérea. La interacción de concentración de sales minerales y el AIB tuvo efecto significativo ( $p \leq 0.05$ ) en el diámetro de tallo. Mientras que la interacción del ácido Indolacético (AIA) y el ácido Indol-3-butírico (AIB), tuvo efecto altamente significativo ( $p \leq 0.01$ ) en el diámetro del tallo.

En los grupos de brotes que se establecieron en medios de cultivo sin auxinas, o con AIA o AIB, el 73, 89 y 95% de los brotes formó raíces adventicias, respectivamente. El uso combinado de AIB + AIA mostró un efecto intermedio entre cada tipo de auxina sola, en el número de brotes que formaron raíces (Tabla 2). Al ordenar los datos en función de la concentración de las sales minerales (Smin) en el medio (Tabla 2), los brotes establecidos con Smin-100% y los brotes en el medio con Smin-75%, el 87.5 y 92.1% de esos brotes formaron raíces, además los tallos fueron de 6.3 y 5.6 mm de diámetro, y el peso fresco de la parte aérea fue de 1.18 y 0.96 g, respectivamente, magnitudes diferentes (Tukey 0.05).

Los contrastes ortogonales (Tabla 3) indican que los brotes que se establecieron en medios de cultivo con auxinas, solas o combinadas, formaron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) mayor número de hojas (NH), número de raíces (NR), longitud de raíz (LR), diámetro de tallo (DT) y peso seco de raíz (PSR), en comparación con los brotes en medios de cultivo sin auxinas. Los brotes en medios de cultivo con AIB formaron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) más NH, NR, LR, que los brotes que se establecieron en medios de cultivo en que se agregaron AIB y AIA combinados. Los brotes en medios de cultivo con AIB formaron significativamente ( $p \leq 0.05$ ) más NR y PSR, que los brotes en medios de cultivo con AIA. Por lo tanto, el AIB para *A. potatorum* es la mejor auxina para promover la formación de raíces adventicias y el crecimiento de los brotes. Los brotes en medios de cultivo con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de AIA desarrollaron tallos de 6.4 mm de diámetro, magnitud 3.2% mayor y significativamente ( $p \leq 0.05$ ) diferente al diámetro de tallo de los brotes en medio de cultivo con  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  de

AIA.

### Aclimatación de plantas micropropagadas

Al inicio de la aclimatación las plantas de *A. potatorum* presentaban hojas de 5 cm longitud y 0.7 cm de ancho, flácidas, y de bordes lisos. Pero a los 60 días de exposición a mayor radiación solar, las plantas habían formado hojas nuevas que fueron más rígidas y gruesas, además de espinas marginales (Figura 1b). El análisis de varianza (Tabla 4) a los 30 días de aclimatación, muestran que las concentraciones de las soluciones nutritivas tuvieron efectos diferentes altamente significativos ( $p \leq 0.01$ ) para el número (NH) y ancho de las hojas (ANH), así como para el diámetro del tallo (DT). Mientras que a los 90 días (Figura 1c), las concentraciones de las soluciones nutritivas tuvieron efectos diferentes significativos ( $p \leq 0.05$ ) para NH, ANH, diámetro de tallo (DT), altura de la hoja más larga (AHL), volumen de raíz (VOLR) y peso fresco de la parte aérea (PFA).

Las plantas mostraron crecimiento positivo en relación con la cantidad de nutrimentos que recibieron mediante la solución nutritiva, ya que a los 90 días de aclimatación las plantas fertirrigadas con SN-25% y las plantas que recibieron SN-50%, tuvieron en promedio 7.4 y 8.9 hojas; siendo la hoja más grande de 6.6 y 8.4 cm de longitud, de 1.0 y 1.3 cm de ancho; tallo de 8.5 y 10.2 mm de diámetro; parte aérea de 2.4 y 4.1 g de peso fresco, así como 0.19 y 0.31 g de peso seco, magnitudes que en cada caso fueron significativamente diferentes (Tukey, 0.05).

De los tres grupos de 67 plantas de *A. potatorum* micropropagadas que se transfirieron a sustrato turba-perlita (1:2) para su aclimatación en invernadero, del 84 a 90% de estas plantas sobrevivieron, y aquellas plantas que se fertirrigaron con la SN-25% fueron las más pequeñas de las que menor cantidad (84%) sobrevivió (Tabla 5). Las plantas micropropagadas, que se establecieron en sustrato turba-perlita (1:2), y recibieron solución nutritiva Steiner (1984) diluida al 50%, y aclimatadas durante 90 días en invernadero sobrevivió el 90% y fueron las más grandes en la mayoría de las características morfológicas.

**Tabla 2.** Características de enraizado de brotes de *Agave potatorum* Zucc., cultivados *in vitro* en función del contenido de sales minerales.

Factor	BroF(%)	AHL (cm)	NH	NR	LR (cm)	NB	DT (mm)
Smin							
75%	92.1%	5.8±1.1 <sup>a</sup>	7.1±1.4 <sup>a</sup>	4.0±0.7 <sup>a</sup>	4.85±3.0 <sup>a</sup>	2.6±2.4 <sup>a</sup>	5.6±1.6 <sup>b</sup>
100%	87.5%	5.9±1.3 <sup>a</sup>	6.7±1.5 <sup>a</sup>	4.2±1.9 <sup>a</sup>	4.40±2.6 <sup>a</sup>	3.0±2.3 <sup>a</sup>	6.3±1.7 <sup>a</sup>
Smin		PFA (g)	PSA (g)	PFR (g)	PSR (g)		
75%	92.1%	0.96±0.5 <sup>b</sup>	0.11±0.1 <sup>a</sup>	0.04±0.05 <sup>a</sup>	0.01±0.01 <sup>a</sup>		
100%	87.5%	1.2±0.5 <sup>a</sup>	0.12±0.1 <sup>a</sup>	0.03±0.03 <sup>a</sup>	0.01±0.01 <sup>a</sup>		

Smin = sales minerales; BroF = porcentaje de brotes que formaron raíces; AHL = altura de hoja más larga; NH = número de hojas; NR = número de raíces; LR = longitud de la raíz; NB = número de brotes, DT = diámetro del tallo; PFA = peso fresco parte aérea; PSA = peso seco de la parte aérea; PFR = peso fresco raíz; PSR = peso seco de raíz. Medias con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente (Tukey, 0.05).

**Tabla 3.** Contrastes ortogonales de características de enraizado de brotes de *Agave potatorum* Zucc., cultivados *in vitro* a los 66 días.

GC	BroF %	AHL	NH	NR	NB	LR	DT	PFA	PSA	PFR	PSR
G1 vs	73	5.7 <sup>a</sup>	6.0 <sup>b</sup>	2.6 <sup>b</sup>	2.7 <sup>a</sup>	3.0 <sup>b</sup>	4.7 <sup>b</sup>	0.91 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>	0.003 <sup>b</sup>
G2	92	5.9 <sup>a</sup>	7.0 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>	2.8 <sup>a</sup>	4.8 <sup>a</sup>	6.1 <sup>a</sup>	1.09 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>	0.008 <sup>a</sup>
G2 vs	92	5.9 <sup>a</sup>	7.0 <sup>b</sup>	4.3 <sup>b</sup>	2.8 <sup>a</sup>	4.8 <sup>b</sup>	6.1 <sup>a</sup>	1.09 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>	0.008 <sup>a</sup>
G3	95	6.2 <sup>a</sup>	7.1 <sup>a</sup>	4.7 <sup>a</sup>	2.7 <sup>a</sup>	5.0 <sup>a</sup>	6.6 <sup>a</sup>	1.07 <sup>a</sup>	0.12 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	0.009 <sup>a</sup>
G2 vs	92	5.9 <sup>a</sup>	7.0 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>	2.8 <sup>a</sup>	4.8 <sup>a</sup>	6.1 <sup>a</sup>	1.09 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>	0.008 <sup>a</sup>
G4	89	5.6 <sup>a</sup>	7.0 <sup>b</sup>	3.5 <sup>b</sup>	2.5 <sup>a</sup>	4.4 <sup>b</sup>	6.3 <sup>a</sup>	0.95 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.005 <sup>a</sup>
G3 vs	95	6.2 <sup>a</sup>	7.1 <sup>a</sup>	4.7 <sup>a</sup>	2.7 <sup>a</sup>	5.0 <sup>a</sup>	6.6 <sup>a</sup>	1.07 <sup>a</sup>	0.12 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	0.009 <sup>a</sup>
G4	89	5.6 <sup>a</sup>	7.0 <sup>a</sup>	3.5 <sup>b</sup>	2.5 <sup>a</sup>	4.4 <sup>a</sup>	6.3 <sup>a</sup>	0.95 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.005 <sup>b</sup>
G5 vs	88	5.1 <sup>a</sup>	6.9 <sup>a</sup>	3.8 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	4.2 <sup>a</sup>	6.2 <sup>b</sup>	0.96 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.005 <sup>a</sup>
G6	90	6.1 <sup>a</sup>	7.0 <sup>a</sup>	3.1 <sup>a</sup>	2.9 <sup>a</sup>	4.6 <sup>a</sup>	6.4 <sup>a</sup>	0.94 <sup>a</sup>	0.09 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>	0.005 <sup>a</sup>
G7 vs	96	6.2 <sup>a</sup>	7.3 <sup>a</sup>	4.5 <sup>a</sup>	3.0 <sup>a</sup>	4.6 <sup>a</sup>	6.7 <sup>a</sup>	0.96 <sup>a</sup>	0.12 <sup>a</sup>	0.03 <sup>a</sup>	0.007 <sup>a</sup>
G8	94	6.1 <sup>a</sup>	6.9 <sup>a</sup>	4.89 <sup>a</sup>	2.4 <sup>a</sup>	5.3 <sup>a</sup>	6.6 <sup>a</sup>	1.18 <sup>a</sup>	0.12 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.01 <sup>a</sup>

GC = grupos comparados; G1 = test; G2 = AIB + AIA; GC2 = AIB + AIA; G3 = AIB; G4 = AIA; G5 = AIA 0.1 mg L<sup>-1</sup>; G6 = AIA 0.5 mg L<sup>-1</sup>; G7 = AIB 0.1 mg L<sup>-1</sup>; G8 = AIB 0.5 mg L<sup>-1</sup>; BroF = porcentaje de brotes formados; AIA = ácido Indolacético; AIB = ácido Indolbutírico AHL = altura de hoja más larga; NH = número de hojas; NR = número de raíz; LR = longitud de la raíz; NB = número de brotes, DT = diámetro del tallo, PFA = peso fresco parte aérea; PSA = peso seco parte aérea; PFR = peso fresco raíz; PSR = peso seco de raíz. Medias con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente (Tukey, 0.05).

**Tabla 4.** Cuadrados medios del análisis de varianza de características de plantas de *Agave potatorum* Zucc., micropropagadas, y aclimatación en invernadero con solución nutritiva Steiner.

Cuadrados Medios y Significancia								
F.V	GL	AHL30	AHL90	NH30	NH90	ANH30	ANHS90	DT30
SN	2	0.42ns	7.62*	8.23**	5.63*	0.15**	0.32*	3.30*
Error	27	1.41	1.97	0.75	1.51	0.01	0.05	0.97
Total	29							
F.V	GL	DT90	NRP90	VOLR	PFA	PSA	PFR	PSR
SN	2	9.04*	7.23ns	0.08*	7.48*	0.03ns	0.001ns	0.00ns
Error	27	1.66	2.4	0.01	1.79	0.28	0.004	0.001
Total	29							

F.V = fuentes de variación; GL = grados de libertad; SN = solución nutritiva; AHL30 = altura de la hoja más larga en el día 30; AHL90 = altura de la hoja más larga a los 90 días; NH30 = número de hojas; NH90 = número de hojas a los 90 días; ANH30 = ancho de la hoja; ANH90 = ancho de la hoja a los 90 días; DT30 = diámetro del tallo; DT90 = diámetro del tallo a los 90 días; NRP = número de raíces principales; VOLR = volumen de raíz; PFA = peso fresco de la parte aérea; PSA = peso seco de la parte aérea; PFR = peso fresco de la raíz; PSR = peso seco de la raíz; \* = significativo (p > 0.05); \*\* = altamente significativo (p ≤ 0.01).

**Tabla 5.** Características plantas de *Agave potatorum* Zucc., micropropagadas aclimatizadas en invernadero por 90 días.

Fact SN	SP (%)	AHL30 (cm)	AHL90 (cm)	NH30	NH90	ANH30 (cm)	ANH90 (cm)	DT30 (mm)
25	84	5.2 ± 1.1 <sup>a</sup>	6.7 ± 1.3 <sup>b</sup>	5.6 ± 0.7 <sup>b</sup>	7.4 ± 1.0 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.7 ± 0.9 <sup>a</sup>
50	90	5.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	8.4 ± 1.2 <sup>a</sup>	7.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	8.9 ± 1.2 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	6.73 ± 1.0 <sup>a</sup>
100	87	5.1 ± 1.5 <sup>a</sup>	7.7 ± 1.7 <sup>ab</sup>	7.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	8.2 ± 1.5 <sup>ab</sup>	0.78 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.6 ± 1.0 <sup>a</sup>
Fact SN		DT90 (mm)	NRP90	VOLR (cm3)	PFA (g)	PSA (g)	PFR (g)	PSR (g)
25	84	8.5 ± 0.9 <sup>b</sup>	5.1 ± 1.9 <sup>a</sup>	5.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.44 ± 1.07 <sup>b</sup>	0.19 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.10 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>
50	90	10.3 ± 1.6 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.9 <sup>a</sup>	5.3 ± 0.1 <sup>ab</sup>	4.15 ± 1.62 <sup>a</sup>	0.31 ± 0.12 <sup>a</sup>	0.11 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>
100	87	8.8 ± 1.2 <sup>b</sup>	6.8 ± 1.8 <sup>a</sup>	5.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.07 ± 1.26 <sup>ab</sup>	0.25 ± 0.08 <sup>ab</sup>	0.12 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>

SN = solución nutritiva; SP = plantas supervivientes; AHL30 = altura de la hoja más larga; AHL90 = altura de la hoja más larga a los 90 días; NH30 = número de hojas; NH90 = número de hojas a los 90 días; ANH30 = ancho de la hoja; ANH90 = ancho de la hoja a los 90 días; DT30 = diámetro del tallo; DT90 = diámetro del tallo a los 90 días; NRP = número de raíces principales; VOLR = volumen de raíz; PFA = peso fresco de la parte aérea; PSA = peso seco de la parte aérea; PFR = peso fresco de la raíz; PSR = peso seco de la raíz; Medias con la misma letra en cada columna no son diferentes estadísticamente (Tukey, 0.05).

## DISCUSIÓN

### Enraizado de brotes

Las auxinas son reguladores de crecimiento a los que se atribuye la propiedad de estimular la formación de raíces adventicias, además de promover el crecimiento por medio de los mecanismos de elongación celular. Para el enraizado de brotes de *Furcraea macrophylla* Baker, en medio de cultivo con AIA y AIB, se reporta que el 100 y 92% de los brotes formaron raíces después de los 15 a 30 días (Martínez y Pacheco 2006). Lo que se debe a que el ácido indolacético (AIA) es la principal auxina nativa que se sintetiza en el ápice del brote y en las yemas laterales, para luego ser transportada basipetalamente, mientras que el AIB es una auxina sintética. Para enraizar segmentos de tallo de *Pisum sativum* (Nordström *et al.* 1991) y *Arabidopsis* se reporta que la auxina sintética AIB ejerció un efecto superior que la auxina natural AIA para estimular la formación de raíces adventicias y el crecimiento de los tallos (Ludwig-Müller *et al.* 2005), lo cual coincide con los resultados del presente trabajo.

En diversas especies vegetales se ha determinado la importancia de evaluar diferentes tipos y concentraciones de auxinas, en que se obtenga la mejor respuesta de enraizado de brotes. Ya que para el enraizado de brotes de chayote, *Sechium edule*, establecidos en medio de cultivo con sales minerales al 65% y 3.0 mg L<sup>-1</sup> de AIA, desarrollaron casi el doble en cantidad de raíces, en comparación a brotes

establecidos en medio de cultivo con 0.05 mg L<sup>-1</sup> de AIB (García-García *et al.* 2015). Para el enraizado *in vitro* de segmentos nodales de *Dalia* sp., en medios de cultivo con concentraciones diferentes (0, 0.1, 0.5 y 1 mg L<sup>-1</sup>) de AIA, la adición de 0.5 mg L<sup>-1</sup> de dicha auxina promovió que mayor porcentaje de segmentos nodales formarían raíces adventicias, así como la cantidad de raíces y el crecimiento del tallo (Jiménez-Mariña *et al.* 2019). En los tejidos vegetales se encuentran auxinas endógenas sintetizadas en las hojas jóvenes y ápice del tallo (Ludwig-Müller *et al.* 2005), lo que sugiere que los brotes de *A. potatorum* que formaron raíces adventicias en los medios de cultivo sin reguladores de crecimiento, posiblemente sintetizaban endógenamente auxinas. Mientras que la aplicación exógena de una auxina fue complemento importante para aquellos brotes que pudieran tener niveles bajos de auxinas endógenas. Las auxinas exógenas estimularon que los brotes formaran más raíces adventicias. Los resultados del presente estudio difieren con lo descrito por Reyes-Zambrano *et al.* (2016), quienes mencionaron que en *Agave americana* L. tanto la cantidad de raíces y su longitud, no se vieron afectadas por el AIB. En especies como *Rosa centifolia* (Baig *et al.* 2011) y *Prunus empyrean* (Sadeghi *et al.* 2015), se ha demostrado que el AIB tiene mayor efecto para inducir el enraizamiento de brotes de *Rosa damascena* Mill. (Pati *et al.* 2004), pero es necesario investigar para cada especie la dosis óptima de auxina, ya que concentraciones de AIB superiores al óptimo inhiben el desarrollo de raíces

(Baker y Wetzstein 2004). Al respecto se sabe que en algunas especies, las combinaciones en una proporción alta de auxinas y bajas de citocininas mejoran la respuesta en el enraizado de brotes (Buyukdemirci 2008).

Además del efecto superior que tuvo el AIB en comparación al AIA para promover en los brotes de *Agave potatorum* la formación de raíces adventicias, pudo estar presente más AIB en forma biológicamente activa, en comparación a los medios de cultivo con AIA. Ya que parte de las auxinas son degradadas durante la esterilización mediante autoclave del medio de cultivo. También se sabe que el AIA es más propenso que el AIB a degradación por temperaturas elevadas, de tal manera que Epstein y Ludwig-Müller (1993) mencionan que debido a esterilización en autoclave las concentraciones de AIA y AIB son reducidas en 40 y 20%, respectivamente.

En tejidos de tallo la formación de raíces adventicias después de que son estimuladas por auxinas algunas células específicas son activadas y en las primeras 24 horas acumulan almidón, que luego se degrada como paso previo a que las células asuman divisiones celulares, formación de meristemoides, y posteriormente primordios de raíz con una típica forma de domo. Por lo que la presencia de auxinas se requiere en la etapa de activación de las células (Klerk 1996). Pero en el presente trabajo la evidencia mostro que de los grupos de brotes que se establecieron en el medio con las sales minerales a 75%, se formó mayor cantidad de raíces adventicias, que los grupos de brotes establecidos con las sales minerales al 100%. En la propagación *in vitro* de *Agave americana* var. *oaxacensis* (Miguel-Luna et al 2013) y en *Agave angustifolia* (Enríquez-del Valle et al. 2005) se reporta que todos los brotes formaron raíces adventicias entre los 12 y 21 días de incubación, aun en los medios de cultivo sin auxinas, pero que los brotes en medios de cultivo con menor cantidad, 66 y 50% de sales minerales MS, y con auxinas, formaron mayor cantidad de raíces y en menor tiempo, en comparación a grupos de brotes que se establecieron en medio de cultivo con las sales minerales a 100%.

### Aclimatación de plantas micropropagadas

Las plantas micropropagadas poseen características morfológicas y fisiológicas, cutícula delgada e ineficiente funcionamiento de los estomas, por lo que son susceptibles a la deshidratación, lo que dificultan su transferencia directa a condiciones *ex vitro*, por lo que es importante someterlas a una etapa de aclimatación (Pospíšilová et al. 1999). Por lo que los primeros 10 días de aclimatización se les debe proporcionar humedad relativa alta, radiación solar disminuida a 40 o 50%, y en días posteriores exponerlas gradualmente a menor humedad relativa y mayor radiación solar (Gil-Rivero et al. 2017). En diversas especies de agaves micropropagados: *A. fourcroydes* (Abreu et al. 2007), *A. americana* var. *oaxacensis* (Yescas-Arreola et al. 2016, Cruz-García et al. 2017), *A. potatorum* (Luna-Luna et al. 2017) se describe que en los primeros 35 a 70 días de aclimatación, ocurre la senescencia de hojas que las plantas formaron durante su cultivo *in vitro*, para ser sustituidas por hojas que presentan mayor área foliar, succulencia, engrosadas, rígidas, haces vasculares, lo que se relaciona con adaptación al ambiente *ex vitro*. Al respecto, Sánchez et al. (2020) describieron que plantas micropropagadas de *A. angustifolia* y transferidas a condiciones *ex vitro*, transcurridos 60 días, presentaron desarrollo estomático, aumento de la deposición de ceras, incremento de tamaño y número adaxial, desarrollo de estructuras papilares y formación de cristales de oxalato de calcio en la epidermis, por lo que las plantas requieren de 60 días de acondicionamiento en invernadero antes de ser trasladadas a vivero, ya que pasan a la fase de endurecimiento.

Las plantas a las que se aplicó la SN-100% no mostraron crecimiento adicional con respecto a las plantas fertirrigadas con SN-50% (Tabla 4). Los cuales son resultados diferentes a los descritos en *A. americana* (Cruz-García et al. 2017, Pérez-Santiago et al. 2014) y en *A. angustifolia* (Enríquez-Del Valle et al. 2012), a las que se aplicó la solución nutritiva al 100%, y fueron las más grandes al concluir la aclimatación.

Las plantas de tamaños inferiores a 7 cm de talla y de menos de 0.51 g de peso fresco, tuvieron menor sobrevivencia. Al respecto Aureoles-

Rodríguez *et al.* (2008) mencionan que en *Agave inaequidens* Koch, las plantas menores a 4 cm y con pocas raíces, tienen menor sobrevivencia, mientras que plantas de tamaño superior a 4 cm, tienen mayor sobrevivencia. Se sabe que es importante que las plántulas *in vitro* sean de buena calidad evaluado en cantidad y tamaño de hojas, diámetro de tallo, volumen de raíz, características que influyen en el porcentaje de plantas que sobreviven *ex vitro* (Sánchez-Rodríguez *et al.* 2012). Sobre lo mismo, Cabrera (1999) menciona que el sustrato con turba y perlita presenta 93% de porosidad total, al combinar sustrato orgánico (turba) con inorgánico (perlita) ayuda a mejorar principalmente sus propiedades físicas y químicas, como la capacidad de retención de agua y poros de aire. De acuerdo con Anicua-Sánchez *et al.* (2009) y Yescas-Arreola *et al.* (2016) la materia orgánica en el sustrato estabiliza el pH, la capacidad de intercambio catiónico y la disponibilidad de nutrientes, mientras que la perlita aporta estabilidad para conservar entre un 77.4 y 85% de porosidad para la retención de agua y la aireación de las raíces.

## CONCLUSIONES

El uso de 0.1 a 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIB en el medio de cultivo estimuló entre el 94 y 96% de brotes de *Agave potatorum* formase raíces adventicias. Hasta el 92% de los brotes formaron raíces adventicias cuando se establecieron en el medio de cultivo con las sales minerales al 75%, mientras que en el medio de cultivo con 100% de sales minerales solo el 87.5% de los brotes formó raíces. Los brotes en medio de cultivo con sales minerales al 100% desarrollaron plantas con diámetro de tallo y peso fresco de la parte aérea que fueron un 12.5 y 25% mayores, que los brotes en medio de cultivo con las sales minerales a 75%. Del total de plantas micropropagadas y aclimatadas en sustrato turba-perlita (1:2), a los 90 días, entre el 84 y 90% se aclimataron. Las plantas fertirrigadas con la solución nutritiva al 50% de concentración de nutrientes de la formulación Steiner, presentaron mayor crecimiento en número de hojas, diámetro del tallo, peso fresco y peso seco, en comparación con las plantas que recibieron solución nutritiva al 25%.

## LITERATURA CITADA

- Abreu E, González G, Ortiz R, Rodríguez P, Domech R, Garriga M (2007) Evaluación de vitroplantas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.) durante la fase de aclimatización. *Cultivos Tropicales* 28: 5-11.
- Aguilar-Jiménez D, Rodríguez-de la O JL (2018) Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana Biotecnología* XX: 124-131.
- Aguirre-Dugua X, Eguiarte LE (2013) Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments* 90: 36-44.
- Alvarez C, Sáez P, Sáez K, Sanchez-Olate M, Ríos D (2012) Effects of light and ventilation on physiological parameters during *in vitro* acclimatization of *Gevuina avellana* mol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 110: 93-101.
- Anicua-Sánchez R, Gutiérrez-Castorena Ma del C, Sánchez-García P, Ortiz-Solorio C, Volke-Halle VH, Rubiños-Panta JE (2009) Tamaño de partícula y relación micromorfológica en propiedades físicas de perlita y Zeolita. *Agricultura Técnica en México* 2: 147-156.
- Aureoles-Rodríguez F, Rodríguez-de la O JL, Legaria-Solano JP, Sahagun-Castellanos J, Peña-Ortega MG (2008) Propagación *in vitro* del Maguey bruto (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazadas de interés económico. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14: 263-269.
- Baig MMQ, Hafiz IA, Hussain A, Ahmad T, Abbasi NA (2011) An efficient protocol for *in vitro* propagation of *Rosa gruss* an teplitz and *Rosa Centifolia*. *African Journal of Biotechnology* 10: 4564-4573.

- Baker CM, Wetzstein HY (2004) Influence of auxin type and concentration on peanut somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 361 -368.
- Blok C, Wever G (2008) Experience with selected physical methods to characterize the suitability of growing media for plant growth. *Acta Horticulturae* 779: 239- 250.
- Buyukdemirci H (2008) The effects of médium ingredients on shoor propagation and rooting of cherry rootstocks *in vitro*. *Acta Horticulturae* 795: 419-422.
- Cabrera RI (1999) Propiedades, uso y manejo de sustratos de cultivo para la producción de plantas en maceta. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 5-11.
- Chandra S, Bandopadhyay R, Kumar V, Chandra R (2010) Acclimatization of tissue cultured plantlet: from laboratory to land *Biotechnology Letters* 32: 1199.1205.
- Colunga GMP, Zizumbo VD, Martínez TJ (2007) Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a su protección legal y conservación biológica y cultural. En: en lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Colunga GMP, Larqué SA, Eguiarte L E, Zizumbo VD (Eds.). CICY-CONACYT-CONABIO-INE. México. pp: 229-248.
- Cruz-García H, Campos-Ángeles GV, Enríquez-del Valle JR, Velasco-Velasco VA, Rodríguez-Ortiz G (2017) Senescencia foliar en plantas micropropagadas de *Agave americana* durante su aclimatización. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8: 381-391.
- Deb CR, Imchen T (2010) An efficient *in vitro* hardening technique of tissue culture raised plants. *Biotechnology* 9: 79-83.
- Enríquez-del Valle JR (2008) La Propagación y Crecimiento de Agaves. Fundación Produce Oaxaca. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. México. 46 p.
- Enríquez-del Valle JR, Carrillo-Castañeda G, Rodríguez-de la O JL (2005) Sales inorgánicas y ácido Indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28: 175-178.
- Enríquez-del Valle JR, Antonio-Luis KH, Rodríguez-Ortiz G, Campos-Ángeles GV (2016a) Effect of culture medium and incubation on the characteristics of micropropagated agave plants. *Ciencia e Investigación Agraria* 43: 263-272.
- Enríquez-del Valle JR, Alcará-Vázquez SE, Rodríguez-Ortiz G, Miguel-Luna ME, Manuel Vázquez C (2016b) Fertirriego en vivero a plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas-aclimatizadas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7: 1167-1177.
- Enríquez-del Valle JR, 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.
- Enríquez del-Valle JR, Estrada-Silias A, Rodríguez-Ortiz G, Velasco-Velasco VA, Campos-Ángeles GV (2013) Sustrato y dosis de fertirriego en la aclimatización de vitroplantas de *Agave americana* var. *oaxacensis*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias* 45: 341-348.
- Epstein E, Ludwig-Müller J (1993) Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, biosynthesis, metabolism, and transport. *Physiologia Plantarum* 88: 382-389.
- García-García J, Salas-Alvarado E, Azofeifa Bolaños J (2015) Efecto del AIA y el AIB sobre el enraizamiento *in vitro* de brotes de *Sechium edule* (Jacq.) Sw. *Biociencia Vegetal* 15: 3-7.

- Gil-Rivero AE, López-Medina SE, López-Zavaleta A (2017) Aclimatación de plántulas *in vitro* de *Saintpaulia ionantha* H. Wendl. (Gesneriaceae) “violeta africana” a condiciones de invernadero. *Arnaldoa* 24: 343-350.
- Jiménez-Mariña L, Fonseca-Arias M, García-Alcántara A, Infante-Fonseca S, Vázquez-Rodríguez J (2019) Efecto de diferentes concentraciones de ácido indolacético (AIA) en el enraizamiento *in vitro* de *Dhalia* sp. *Cultivos Tropicales* 40: 1-12.
- Klerk G (1996) Markers of adventitious root formation. *Agronomie* 16: 609-616.
- Lesar H, Hlebec B, Ceranic N, Kastelec D, Luthar L (2012) Acclimatization of terrestrial orchid *Bletilla striata* Rchb.f. (Orchidaceae) propagated under *in vitro* conditions. *Acta agriculturae Slovenica* 99: 69-75.
- Ludwig-Müller J, Vertocnik A, Town CD (2005) Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *Journal of Experimental Botany* 56: 2095-2105.
- Luna-Luna S, Enríquez-del Valle JR, Rodríguez-Ortiz G, Carrillo-Rodríguez JC, Velasco-Velasco VA (2017) Anatomía y morfología de plantas micropropagadas-aclimatadas de *Agave potatorum* Zucc. fertilizadas en vivero. *Revista Fitotecnia Mexicana* 40: 491-494.
- Martínez MA, Pacheco JC (2006) Protocolo para la micropropagación de *Furcraea macrophylla* Baker. *Agronomía Colombiana* 24: 207-213.
- Miguel-Luna ME, Enríquez-del Valle JR, Velasco Velasco VA, Villegas-Aparicio Y, Carrillo-Rodríguez JC y Rodríguez-Ortiz G (2013) Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de *Agave*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6: 1151-1159.
- Monja-Mio KM, Barredo-Pool F, Herrera-Herrera G, EsquedaValle M, Robert ML (2015) Development of the stomatal complex and leaf Surface of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora' plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process. *Scientia Horticulturae* 189: 32- 40.
- Murashighe T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 573-487.
- Nordström A-C, Alvarado FJ, Eliasson L (1991) Effect of Exogenous Indole-3-Acetic Acid and Indole-3-Butyric Acid on Internal Levels of the Respective Auxins and Their Conjugation with Aspartic Acid during Adventitious Root Formation in Pea Cuttings. *Plant Physiology* 96: 856-861.
- Pati PK, Prakash O, Sharma M, Sood A, Ahuja PS (2004) Growth performance of cuttings raised from *in vitro* and *in vivo* propagated stock plants of *Rosa damascena* Mill. *Biologia Plantarum* 48: 609-611.
- Pérez-Molphe E, Esparza-Araiza MJ, Pérez-Reyes ME (2012) Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. Bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotecnia Mexicana* 35: 279-287.
- Pérez-Santiago R, Enríquez-del Valle JR, Castañeda-Hidalgo E, Velasco-Velasco VA, Rodríguez-Ortiz G, Campos-Ángeles GV (2014) Dosis de fertilización durante la aclimatación de plantas de *Agave americana* micropropagadas. *Revista Mexicana de Agroecosistemas* 1: 20-27.
- Pospíšilová J, Tichá I, Kadleček P, Haisel D, Plzáková Š (1999) Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biology Plantarum* 42: 481-497.
- Reyes-Zambrano SJ, Lecona-Guzman CA, Barredo-Pool FA, Ambrosio-Calderon JD, Abud-Archila M, Rincon-Rosales R, Ruiz-Valdiviezo VM, Gutiérrez-Miceli FA (2016) Plant growth regulators optimization for maximiza shoots number in *Agave americana* L. by indirect organogenesis. *Gayana Botanica* 73: 124-131.
- Sadeghi F, Yadollahi A, Jafarkhani-Kermani M, Eftekhari M (2015) Optimizing culture media for *in vitro* proliferation and rooting of Tetra (*Prunus empyrean* 3) rootstock. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 13: 19-23.

- Sánchez-Rodríguez LA, Saavedra-Hortúa D, Mauricio-Romero H (2012) Aclimatación y endurecimiento de materiales de palma de aceite obtenidos mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales. *Revista Palmas* 33: 41-52.
- Sánchez A, Coronel-Lara Z, Gutiérrez A, Vargas G, Coronado ML, Esqueda M (2020) Aclimatación y transplante de vitroplantas de *Agave angustifolia* Haw. en condiciones silvestres. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11: 1593-1605.
- Steiner AA (1984) The universal nutrient solution, In: *Proceeding Sixth International Congress on Soilless Culture*. Lunteren Wageningen. The Netherlands. pp: 633-650.
- Woodward AW, Bartel B (2005) Auxin: regulation, action and interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.
- Yescas-Arreola E, Campos-Ángeles GV, Enríquez-del Valle JR, Velasco-Velasco VA, Rodríguez-Ortiz G, Ruiz-Luna J (2016) Aclimatación de *Agave americana* var. *oaxacensis* obtenidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7: 911-922.