



DOI: 10.29298/rmcf.v16i88.1504

Artículo de Investigación

**Micropropagación de *Agave angustifolia* Haw., con
fines de aprovechamiento y conservación**
**Micropropagation of *Agave angustifolia* Haw., for use
and conservation purposes**

Armandina De la Cruz-Olvera¹, Miriam Serrano-Muñoz², Adolfo Armando
Rayas-Amor³, René García-Martínez^{4*}

Fecha de recepción/Reception date: 16 de julio de 2024.

Fecha de aceptación/Acceptance date: 3 de diciembre de 2024.

¹Protectora de Bosques del Estado de México (Probosque), Laboratorio de Biotecnología Forestal. México.

²Protectora de Bosques del Estado de México (Probosque), Laboratorio de Sanidad Forestal. México.

³Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Lerma. México.

⁴Tecnológico Nacional de México, Tecnológico de Estudios Superiores Valle de Bravo, División de Ingeniería Forestal. México.

*Autor para correspondencia; correo-e: rene.gm@vbravo.tecnm.mx

*Corresponding author; e-mail: rene.gm@vbravo.tecnm.mx

Resumen

Agave angustifolia es una especie que se utiliza como materia prima para producción de mezcal en el sur del Estado de México, por lo cual se ha incrementado la demanda de planta para el establecimiento de plantaciones. El cultivo de tejidos vegetales ofrece una alternativa para la propagación masiva de plantas; por ello, el objetivo de la presente investigación fue desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro* de la especie. Bajo condiciones *in vitro* se realizó la germinación, multiplicación y elongación de brotes, y formación de raíces, mientras que en vivero se hizo la aclimatación de plantas. El porcentaje de germinación fue superior a 80 % y se registraron diferencias entre los tratamientos de desinfección y medios de cultivo. El uso del medio MS al 100 % + 0.003 mg L⁻¹ de BAP + 0.002 mg L⁻¹ de AIB + 0.1 mg L⁻¹ de pantetonato de calcio produjo mayor número de brotes por planta a los 90 y 120 días. Con el medio de cultivo MS al 75 % se obtuvo 100 % de enraizamiento, con un promedio 6.5 raíces por planta y 45 mm de longitud de la raíz. En la etapa de aclimatación en vivero se presentó 100 % de sobrevivencia en los tres sustratos evaluados y se observaron diferencias en altura, diámetro y materia seca. En conclusión, se generó un protocolo completo para la micropropagación de *Agave angustifolia*, desde la germinación *in vitro* hasta su aclimatación en vivero.

Palabras clave: Biotecnología forestal, cultivo de tejidos, matorral xerófilo, producción de mezcal, propagación de agave, propagación *in vitro*.

Abstract

Agave angustifolia is a species utilized as raw material for mescal production in the South of the *Estado de México*, which is why the demand for the establishment of plantations of this succulent has increased. Plant tissue culture offers an alternative for mass plant propagation; thus, the objective of the present research was to develop a

protocol for the *in vitro* propagation of the species. Germination, shoot multiplication and elongation, and root formation took place under *in vitro* conditions, and the plants were acclimatized in the nursery. The germination percentage was higher than 80 %, and there were differences between disinfection treatments and culture media. The use of 100 % MS medium+0.003 mg L⁻¹ of BAP+0.002 mg L⁻¹ of IBA+0.1 mg L⁻¹ of calcium pantethonate produced a higher number of shoots per plant at 90 and 120 days. With 75 % MS culture medium, 100 % rooting was obtained, with an average of 6.5 roots per plant and 45 mm root length. In the nursery acclimatization stage, there was 100 % survival in the three substrates evaluated and differences were observed in height, diameter and dry matter. In conclusion, a complete protocol was generated for the micropropagation of *Agave angustifolia*, from *in vitro* germination to acclimatization in nursery.

Keywords: Forest biotechnology, tissue culture, xerophytic scrubland, mescal production, *agave* propagation, *in vitro* propagation.

Introducción

Los agaves son endémicos de América y tienen su centro de origen en México (Mandujano et al., 2018), donde se les encuentra, principalmente, en zonas áridas y semiáridas (Pérez et al., 2012). La riqueza de especies endémicas del género *Agave* L. en México se debe, fundamentalmente, a los hábitats heterogéneos que presenta el país, que difieren en clima, geología, suelos, topografía, altitud, entre otros factores ambientales (León et al., 2013). Algunos de los taxones se aprovechan como materia prima para la elaboración de bebidas alcohólicas y fibras naturales, lo cual provoca la disminución de las poblaciones naturales de varios taxa (NOM-059-SEMARNAT-2010, 2010). La lista de especies prioritarias para su conservación incluye seis especies de agaves, entre ellas *Agave angustifolia* Haw. (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [Semarnat], 2014).

Agave angustifolia (maguey delgado, maguey de monte o espadín) crece de manera silvestre y extensa en la Sierra Madre Occidental, en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Durango, Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Sonora y Zacatecas (Fragoso-Gadea et al., 2021). A partir de la savia concentrada en sus zonas meristemáticas apicales se produce el aguamiel que se utiliza para elaborar el pulque. Sus hojas se usan para cocinar la carne de borrego en barbacoa y las flores se utiliza en distintos platillos

(Ávila-Lara *et al.*, 2021). Además, se emplea como remedio para las torceduras o huesos rotos de personas o de animales (Barrientos *et al.*, 2019).

En la actualidad, una de las estrategias con mayor potencial para recuperar, multiplicar y preservar especies vegetales es el cultivo *in vitro* (Suárez, 2020). Por ejemplo, en el estudio de Domínguez *et al.* (2008) con *Agave cupreata* Trel. & A. Berger, *A. difformis* A. Berger, *A. karwinskii* Zucc., *A. obscura* Schiede y *A. potatorum* Zucc., se usaron tejidos meristemáticos extraídos de plántulas germinadas *in vitro* y obtuvieron brotes múltiples a partir de explantes basales en medio Murashige y Skoog (1962), adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar y varios tratamientos con citocininas [6-bencilaminopurina (BA), 6-γ,γ-dimetilalilaminopurina (2iP), cinetina (Cin), tidiazurón (TDZ) y meta-topolina o N6-(metahidroxibencil) adenina (MT)].

En la literatura existen registros exitosos sobre la propagación de agaves mediante esta técnica, tales como: *Agave tequilana* F. A. C. Weber (Ángeles-Espino *et al.*, 2012; Portillo *et al.*, 2007; Ramírez-Malagón *et al.*, 2008), *A. inaequidens* K. Koch (Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008), *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck (Ramírez-Malagón *et al.*, 2008), *A. fourcroydes* Lem. (Garriga *et al.*, 2010), *A. grijalvensis* B. Ullrich (Santíz *et al.*, 2012), *A. americana* L. var. *oaxacensis* Gentry (Cruz *et al.*, 2017; Miguel *et al.*, 2013), *A. angustifolia* (Monja-Mio *et al.*, 2015; Ríos-Ramírez *et al.*, 2017) y *A. potatorum* (Luna-Luna *et al.*, 2017).

En la región sur del Estado de México, la producción de mezcal es una tradición arraigada en muchas comunidades y una fuente de ingresos importante para numerosas familias. El aprovechamiento y la demanda de *A. angustifolia* en esta región genera un incremento en la demanda de planta para establecer plantaciones comerciales. Para atender esa situación, en la Protectora de Bosques del Estado de México (Probosque) se desarrollan técnicas biotecnológicas, como el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, con la finalidad de obtener plantas con características de calidad para su establecimiento en campo. Por lo tanto, el objetivo fue evaluar la efectividad de la propagación *in vitro* para producir planta de *A. angustifolia*, a partir de semilla y su posterior aclimatación en vivero.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

El proyecto se llevó a cabo de junio de 2021 a diciembre de 2023, en el Laboratorio de Biotecnología Forestal de Probosque, ubicado en Metepec, Estado de México. En marzo de 2021 se recolectaron semillas de *A. angustifolia* en el paraje La Joya del Campo, localidad Lagunita, municipio Ocuilán (395569 E, 2130744 N, UTM Zona 14 s). La vegetación corresponde a matorral xerófilo; temperatura media anual de 21.2 °C y precipitación media anual de 1 085.2 mm (Instituto Nacional de Estadística y Geografía [Inegi], 2019). En el proceso de beneficio se realizó la extracción manual de semillas que se limpiaron para eliminar impurezas. Se consideró una muestra representativa del lote para realizar los análisis de calidad de acuerdo con los procedimientos del *International Seed Testing Association* (ISTA, 2025). Las semillas presentaron 46 % de viabilidad, 40.25 % de germinación, 9.36 % de humedad, 98.50 % de pureza, con 92 299 semillas por kilogramo, 0.0069 g por semilla, y longitud de 0.8 a 0.9 mm. El germoplasma se colocó en bolsas de polietileno de alta densidad y se les añadió Captan (*Captán 50 WP*[®], Israel) y Tiabendazol (*Tecto*[®] 60, México) en proporción 1:1, suficiente para impregnar la semilla; posteriormente, se sellaron y colocaron en contenedores de plástico que cierran herméticamente y se almacenaron en una cámara fría a una temperatura de 3-5 °C y 90 % de humedad relativa.

Germinación

En junio de 2021 se inició el experimento en laboratorio. Para la germinación *in vitro* se utilizaron 720 semillas, las cuales se lavaron por agitación manual utilizando una

varilla de vidrio en una solución con detergente *Roma*[®] (1 g L⁻¹) durante tres minutos y enjuagaron con agua corriente. Después, las semillas se desinfectaron con una solución de fungicida [tris-(O-etil fosfonato) de aluminio] *Jabali*[®] (México) (2 g L⁻¹), utilizando un agitador magnético *Thermo Scientific*[®] modelo SP88857100, a una velocidad de 250 rpm durante dos horas. Para el proceso de germinación se instaló un experimento factorial completamente al azar. El Factor A fue el proceso de desinfección a tres niveles: (D1) H₂O₂ al 3 % por 160 min+Detergente *Roma*[®] (1 g L⁻¹) por 3 min+H₂O₂ al 3 % por 10 min+etanol al 70 % por 0.5 min+*Cloralex*[®] (NaClO al 0.6 %) por 10 min; (D2) H₂O₂ al 3 % por 480 min+Detergente *Roma*[®] (1 g L⁻¹) por 3 min+H₂O₂ al 3 % por 10 min+etanol al 70 % por 0.5 min+*Cloralex*[®] (NaClO al 0.6 %) por 15 min; y (D3) H₂O₂ al 3 % por 960 min+Detergente *Roma*[®] (1 g L⁻¹) por 3 min+H₂O₂ (3 %) por 10 min+*Cloralex*[®] (NaClO al 0.6 %) por 10 min.

El Factor B fue el medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) y SH (Schenk & Hildebrandt, 1972) a cinco niveles: (T1) MS al 100 %, (T2) SH al 100 %, (T3) MS al 50 %+0.2 g L⁻¹ de glutamina, (T4) SH al 50 %, y (T5) MS al 50 %. A los medios de cultivo se les adicionó 30 g L⁻¹ de sacarosa, 7 g L⁻¹ de agar bacteriológico como agente gelificante y se ajustó un pH de 5.7. La mezcla se colocó (20 mL) en frascos de vidrio, los cuales se esterilizaron en autoclave (*Felisa*[®] modelo Fe-399) a 121 °C por 15 minutos.

Las 720 semillas se utilizaron para instalar 15 tratamientos, que resultaron de combinar los tres niveles del Factor A (proceso de desinfección) por los cinco niveles del Factor B (medios de cultivo); la unidad experimental fue un frasco con seis semillas y se utilizaron ocho repeticiones por tratamiento, para un total de 120 frascos.

La germinación se realizó en un cuarto de incubación, a una temperatura de 22 °C, humedad relativa de 23 %, fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Como variable de respuesta se evaluó el porcentaje de semillas germinadas por frasco. Los datos se sometieron a una prueba de normalidad, varianzas homogéneas, análisis de varianza y prueba de comparación de medias por el método de *Tukey*, se consideró como referencia un nivel de $p < 0.05$ (Quinn & Keough, 2002). Los

análisis se hicieron en el paquete estadístico SAS[®] 9.4 (Statistical Analysis System Institute [SAS Institute], 2013).

Multiplicación de brotes

Las plántulas obtenidas en la etapa de germinación se utilizaron para la multiplicación de brotes axilares. Para ello, se eligieron individuos con características similares (90 días después de la germinación y 5 cm de altura promedio), a las cuales se les hizo un corte en el cuello de la raíz para inducir la formación de brotes. Se instalaron cinco tratamientos: (T1) MS al 100 %; (T2) MS al 100 % + 0.3 mg L⁻¹ de BAP + 0.2 mg L⁻¹ de AIB; (T3) MS al 100 % + 0.3 mg L⁻¹ de BAP + 0.2 mg L⁻¹ de AIB + 0.1 mg L⁻¹ de pantetonato de calcio (Andrade et al., 2013); (T4) MS al 100 % + 0.8 mg L⁻¹ de BAP + 0.2 mg L⁻¹ de AIB; y (T5) MS al 100 % + 0.8 mg L⁻¹ de BAP + 0.2 mg L⁻¹ de AIB + 0.1 mg L⁻¹ de pantetonato de calcio. Como medio base se utilizó la formulación de MS (Murashige & Skoog, 1962), adicionado con 1 mg L⁻¹ de tiamina, 100 mg L⁻¹ de Myo-inositol y 30 g L⁻¹ de sacarosa. Los reguladores de crecimiento usados fueron: N6-Bencilaminopurina (BAP), ácido indol butírico (AIB) y pantetonato de calcio. Este último compuesto se ha utilizado con éxito en la micropropagación de otras plantas como *Solanum* L. (Andrade et al., 2013). A la mezcla se le ajustó el pH a 5.7 y se agregaron 7 g L⁻¹ de agar bacteriológico (Enríquez et al., 2005). Se colocaron 30 mL en frascos de vidrio y se esterilizaron en autoclave (*Felisa*[®] modelo Fe-399) a 121 °C por 15 minutos.

En esta etapa se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 10 repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue un frasco con tres plántulas. Las variables de respuesta fueron: número y tamaño del brote (mm) que se midió

con un calibrador vernier de 12 cm (*Anelsam*[®] modelo 5"). Los datos se sometieron a un análisis estadístico aplicando prueba de normalidad, varianzas homogéneas, análisis de varianza y prueba de comparación de medias por el método de *Tukey* con un nivel de $p < 0.05$ (Quinn & Keough, 2002). Los análisis se hicieron con el paquete estadístico *SAS*[®] 9.4 (SAS Institute, 2013).

Elongación de brotes

Se eligieron brotes de *A. angustifolia*, obtenidos en la etapa de multiplicación después de 180 días. Brotes sanos de 3 cm de longitud se colocaron en los medios de cultivo correspondientes a cada tratamiento: (T1) MS al 75 %; (T2) MS al 75 % + 3 mg L⁻¹ de kinetina + 3 mg L⁻¹ de BAP; (T3) MS al 75 % + 3 mg L⁻¹ de kinetina + 10 mg L⁻¹ de BAP; (T4) MS al 75 % + 3 mg L⁻¹ de BAP + 0.3 mg L⁻¹ de ANA; (T5) MS al 100 %; (T6) MS al 100 % + 3 mg L⁻¹ de kinetina + 3 mg L⁻¹ de BAP; (T7) MS al 100 % + 3 mg L⁻¹ de kinetina + 10 mg L⁻¹ de BAP; (T8) MS al 100 % + 3 mg L⁻¹ de BAP + 0.3 mg L⁻¹ de ANA. Se decidió probar la combinación de citocininas y auxinas puesto que en literatura no está claro el efecto que tienen sobre la elongación de brotes de *A. angustifolia*.

El diseño experimental fue completamente al azar, con diez repeticiones por tratamiento y la unidad experimental fue un frasco con tres plántulas. La variable de respuesta fue la altura del brote (mm), la cual se midió con un calibrador vernier de 12 cm (*Anelsam*[®] modelo 5"). Los datos se sometieron a análisis estadístico aplicando prueba de normalidad, varianzas homogéneas, análisis de varianza y prueba de comparación de medias por el método de *Tukey* con un nivel de $p < 0.05$ (Quinn & Keough, 2002). Se utilizó el paquete estadístico *SAS*[®] 9.4 (SAS Institute, 2013).

Formación de raíz

Las plantas obtenidas en la etapa de elongación se sometieron a enraizamiento. Para ello, se utilizó el medio de cultivo MS a una concentración de 75 %, sin reguladores de crecimiento. El proceso de formación de raíz ocurrió entre 8 y 12 semanas bajo condiciones de laboratorio en un cuarto de incubación, bajo las mismas condiciones previamente descritas. Se midió la longitud (cm) y diámetro del cuello de la raíz (mm) con un calibrador vernier de 12 cm (*Anelsam*[®] modelo 5"), además se contabilizó el número de raíces. Se calculó el promedio de 300 plantas.

Aclimatación

Las 300 plantas enraizadas se usaron en la etapa de aclimatación. Las características promedio de los individuos fueron: cinco hojas, 7.8 ± 0.8 cm de altura, 1 ± 0.1 cm de diámetro del cuello de la raíz y 6 ± 0.2 cm de longitud de la raíz. Las plantas se colocaron en tres mezclas en volumen de cuatro sustratos diferentes (suelo, tepojal, agrolita *Multiperl*[®] y *peat moss Berger*[®]): (T1) Suelo (40 %)-tepojal (30 %)-*peat moss* (30 %), (T2) Suelo (50 %)-tepojal (50 %), y (T3) Suelo (40 %)-tepojal (30 %)-agrolita (30 %). Las propiedades del suelo utilizado fueron las siguientes: pH (5.6), *CE* (0.04 dS m^{-1}), *MO* (7.8 %), N (0.25 %), P (5.2 mg kg^{-1}), K ($0.1 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$), Ca ($7.7 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$), Mg ($2.1 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$), Na ($0.1 \text{ cmol}^+ \text{ kg}^{-1}$), Fe ($90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Cu ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Zn ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) y Mn ($4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Para la siembra se utilizaron charolas de plástico de 32×32 cm, con 25 cavidades para tubetes de 16.5 cm de largo, diámetro superior de 6 cm, base inferior de 4.5 cm y volumen de 285 cm³. Posterior al trasplante, cada tubete se cubrió con una bolsa de polipapel para mantener la humedad. Las charolas se colocaron en un cuarto de preaclimatación con temperatura 24 °C, humedad relativa 41 % e iluminación con lámparas LED (16 horas luz y 8 de oscuridad). Después de ocho días se retiró la bolsa de polipapel para verificar turgencia en las hojas y sobrevivencia de las plantas; estas se transfirieron a bolsas para vivero de 25 cm de largo y 12.5 cm de diámetro y se establecieron en condiciones de invernadero con temperatura promedio de 20.5 °C y humedad relativa de 52 %.

Después de seis meses, se les midió la altura (cm), diámetro del cuello (cm) y longitud de la raíz (cm) con un calibrador vernier de 12 cm (*Anelsam*[®] modelo 5"). También se cuantificó el número de raíces y contenido de materia seca de la planta. Durante ese periodo, las plantas se regaron cada tercer día y no se aplicó ningún fertilizante.

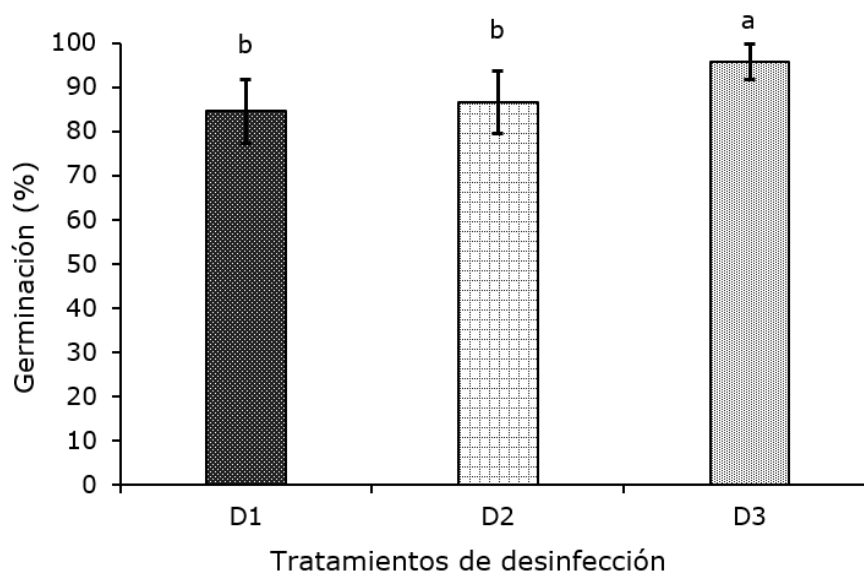
Los datos se sometieron a análisis estadístico mediante un análisis de varianza y prueba de comparación de medias por el método de *Tukey con* un nivel de $p < 0.05$ (Quinn & Keough, 2002); para ello se utilizó el paquete estadístico *SAS*[®] 9.4 (SAS Institute, 2013).

Resultados y Discusión

Tratamientos de desinfección

Se obtuvieron diferencias entre los tratamientos de desinfección ($p < 0.05$), medios de cultivo ($p < 0.05$) y la interacción de tratamientos de desinfección y medios de cultivo

($p < 0.05$) sobre la germinación. En este sentido, el tratamiento de desinfección D3 registró el porcentaje más alto de germinación (Figura 1), y el porcentaje más bajo correspondió a los tratamientos D1 y D2; por lo cual no todos los métodos de desinfección presentaron la misma efectividad para reducir la contaminación. El método D3 tuvo el mayor tiempo de inmersión en H_2O_2 , lo que explica su efectividad. En el estudio de Aguilar-Rito et al. (2024), los niveles más altos de contaminación se observaron en los tratamientos con $Ca(ClO_2)$ y $NaClO$, mientras que el menor porcentaje de contaminación de semillas se presentó en los tratamientos con H_2O_2 .



Letras iguales denotan que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$). D = Desinfección.

Figura 1. Porcentaje de germinación por tratamiento de desinfección.

Los tratamientos D1 y D2 incluyeron el uso de etanol. Sin embargo, este compuesto y otros alcoholes pequeños, al ser surfactantes naturales de interfases acuosas/orgánicas, actúan sobre la membrana celular estresándola mecánicamente

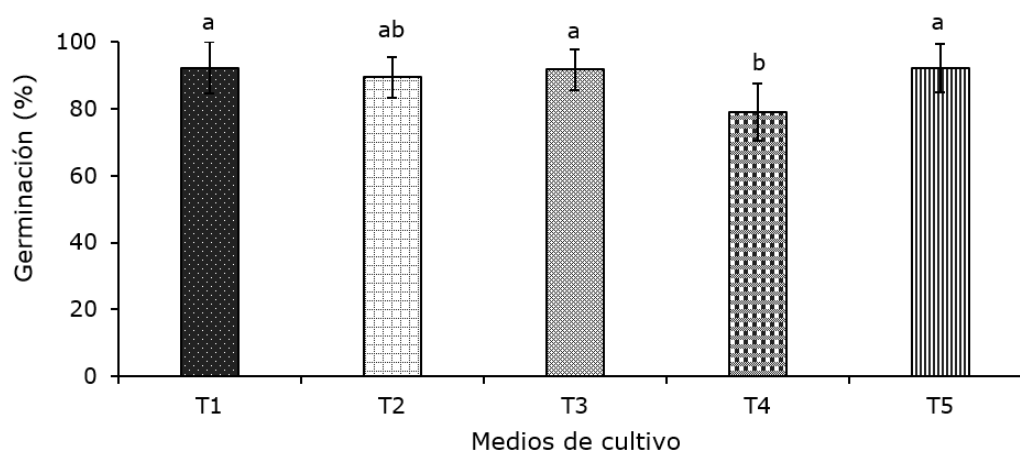
e inhibiendo la adsorción natural de grupos terminales en dichas interfases (Rivera & Lima, 2013), lo cual daña a los tejidos vegetales.

El método D3 se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Forestal de Probosque, en donde se usa de forma habitual para la desinfección de semillas; su aplicación resultó en un mayor porcentaje de germinación, comparado con los tratamientos D1 y D2 (Figura 1). Este procedimiento contrasta con la técnica utilizada por Aguilar-Rito *et al.* (2024), quienes usaron H₂O₂ al 3 % por 24 h+sulfato de cobre al 30 % por 10 min+HgCl₂ 0.1 % por 10 min y obtuvieron un 100 % de desinfección, aunque con tasas de germinación variables. Otras técnicas de desinfección implican el uso de etanol al 96 % por 1 min+NaClO al 3 % por 10 min (Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 2022), o etanol al 70 % por 3 min+NaClO al 0.6 % por 15 min (Correa-Hernández *et al.*, 2022). Finalmente, las plantas provenientes de semilla presentan variabilidad genética comparado con las obtenidas a partir de planta Madre, las cuales se mantienen uniformes genéticamente (Arzate-Fernández *et al.*, 2016). Con fines de conservación, la micropropagación a partir de semillas es recomendable, porque se mantiene la diversidad genética.

Medio de cultivo para la germinación

Con los medios de cultivo T1, T3 y T5 se alcanzó el porcentaje más alto de germinación (Figura 2). Por el contrario, la menor cantidad de semillas germinadas se registró con T4; aunque T2 siguió una tendencia similar. Este comportamiento sugiere que con el medio MS se obtiene mayor germinación. Los resultados de la presente investigación son superiores a los documentados por Téllez *et al.* (2023), quienes utilizaron el medio MS con 50 % de la concentración de sus componentes inorgánicos, suplementado con sacarosa 30 g L⁻¹ y bacto-agar 8.5 g L⁻¹, pH 5.7 y

obtuvieron 56 % germinación en semillas de *A. potatorum* almacenadas por seis meses a 5 °C. Los mismos autores indican una germinación de 31.8 % en semillas germinadas en sustrato bajo condiciones de invernadero. Por su parte, Aguilar-Rito et al. (2024) emplearon medio MS, suplementado con 30 g L⁻¹ sacarosa, 0.5 g L⁻¹ de carbón activado, sin reguladores de crecimiento vegetal y gelificado con 8 g L⁻¹ de agar y obtuvieron un porcentaje de germinación de 85 % para semillas de *A. angustifolia* analizadas en el mismo año de cosecha. Por lo anterior, el protocolo generado incrementó el porcentaje de germinación en semillas de agave comparado con los métodos de germinación convencional; en sustrato la germinación fue de 46 %; mientras que, en condiciones *in vitro* fue de 89 %, en promedio.



Letras iguales denotan que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$). T = Tratamiento.

Figura 2. Porcentaje de germinación por medio de cultivo.

Multiplicación de brotes

Después del establecimiento en el medio de cultivo, se presentaron diferencias entre los tratamientos en el número promedio de brotes obtenidos por explante ($p < 0.05$). A los 90 días, en el T3 se observó el mayor número de brotes y a excepción de T1, en el resto de los tratamientos se registró un incremento en el número de brotes a los 120 días; T3 y T4 fueron superiores. El tratamiento T1 no desarrolló brotes debido a que no contenía citocininas ni auxinas (Cuadro 1). Faisal *et al.* (2018) señalan que los ápices de brotes de *Ruta graveolens* L. no muestra ninguna respuesta morfogénica en medio MS sin regulador de crecimiento. Las auxinas son hormonas exclusivas que pueden transportarse polarmente, crean gradientes y regulan la diferenciación celular; por ello, son responsables de la morfogénesis de los brotes (Pasternak & Steinmacher, 2024). Los niveles altos de citocininas, junto con baja concentración de auxinas afectan sinérgicamente la división celular y la regeneración vegetal *in vitro* (Fatima *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Desarrollo de brotes en *Agave angustifolia* Haw. a los 90 y 120 días de su establecimiento en diferentes medios de cultivo.

Tratamiento	Número de brotes por explante a los 90 días	Número de brotes por explante a los 120 días
T1	0±0c	0±0c
T2	1.9±0.9bc	4.7±1.2ab
T3	4.9±1.1a	6.0±1.3a
T4	3.6±0.6ab	5.5±1.1a
T5	1.2±0.6bc	2.9±1.0b

Letras iguales denotan que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$).

A los 90 días, el T3 generó el mayor número de brotes por planta, y a los 120 días los mejores tratamientos fueron T3 y T4. En el presente estudio, debido a que no

había disponibilidad de TDZ, se utilizó pantetonato de calcio; este compuesto se ha utilizado en la micropropagación de *Solanum mammosum* L. y *S. hirtum* Vahl generando el mayor número de hojas y longitud de planta (Andrade et al., 2013). Las citocininas y auxinas se usan comúnmente en la multiplicación de brotes. Domínguez et al. (2008) citan que la mayor producción de brotes en *Agave cupreata* y *A. karwinskii* se obtiene con 1 y 1.5 mg L⁻¹ de BAP, mientras que en *A. difformis* y *A. obscura* se logra con 0.2 mg L⁻¹ de TDZ.

Miguel-Luna et al. (2023) observaron, en *Agave nussaviorum* García-Mend., que a los 80 días en el medio de cultivo con 1 mg L⁻¹ de BAP y 75 % de MS formaron 6.2 brotes; con 0.5 mg L⁻¹ de BAP y 50 % de MS, 2.0 brotes; y con 0.5 mg L⁻¹ de BAP y 75 % de MS, 4.3 brotes. Finalmente, la combinación de reguladores de crecimiento con dosis bajas de auxina (entre 0.025 y 0.5 mg L⁻¹) y altas de citocinina (entre 3 y 10 mg L⁻¹) estimula la producción de brotes a partir de yemas axilares en *A. angustifolia* (Ríos-Ramírez et al., 2017), *A. guiengola* Gentry (Chávez-Ortiz et al., 2021) y para *A. fourcroydes* (Zhang et al., 2013).

Elongación de brotes

El uso de medio MS al 75 % sin reguladores de crecimiento (T1) fue el más efectivo para la elongación de brotes (Cuadro 2). La evidencia indica que solo el T2 presentó el menor crecimiento de brotes.

Cuadro 2. Elongación de brotes de *Agave angustifolia* Haw. a los 60 días de establecimiento en medio de cultivo.

Tratamiento	Longitud de brotes (mm) 60 días
-------------	---------------------------------

T1	15.4±3.3a
T2	5.9±1.5b
T3	12.4±3.2ab
T4	12.9±1.3ab
T5	10.5±2.5ab
T6	9.9±1.5ab
T7	9.0±2.3ab
T8	9.7±1.7ab

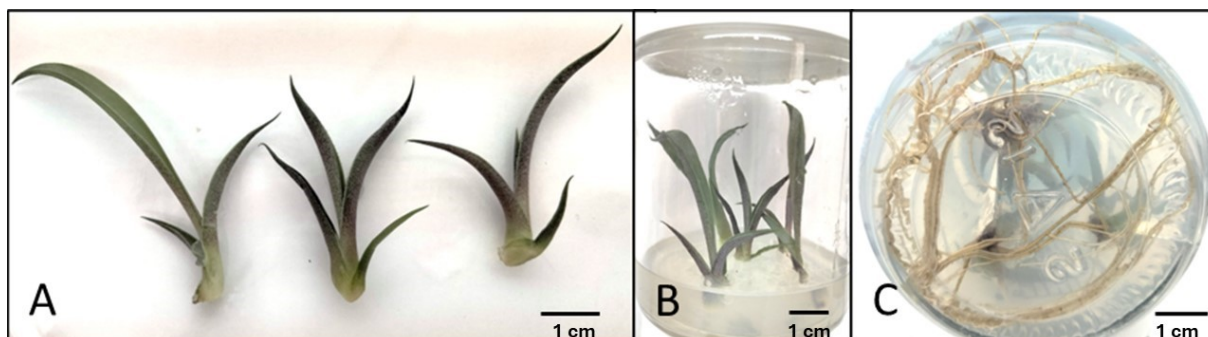
Letras iguales denotan que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$).

En el estudio realizado por Santacruz-Ruvalcaba *et al.* (2022) sobre propagación *in vitro* con *A. maximiliana* Baker se indica que el uso del medio MS con 5 mg L⁻¹ de ácido indol-3-butírico, se obtiene una mayor longitud de los brotes. Por otro lado, Faisal *et al.* (2018) observan en *Ruta graveolens* que el medio MS enriquecido con 10 μ M de benciladenina genera los brotes con mayor longitud. Sin embargo, son necesarios más estudios para dilucidar el efecto de la combinación de auxinas y citocininas en el crecimiento de los brotes de *A. angustifolia*, ya que en las investigaciones publicadas no se evalúa esta etapa por separado.

Formación de raíz

Con el uso del medio de cultivo MS al 75 % se obtuvo 100 % de enraizamiento, con un promedio de 6.5 raíces por planta y 45 mm de longitud de la raíz (Figura 3). Estos resultados coinciden con los de Bautista-Castellanos *et al.* (2020) en *A. potatorum*, especie de difícil enraizado, cuando usaron el medio MS al 75 y 100 % de

concentración de las sales sin auxinas; los autores señalan que 73 % de los brotes forman raíces adventicias.



A = Explantes para inducción de raíz; B = Explantes establecidos en medio MS;
C = Formación de raíz.

Figura 3. Etapa de formación de raíz en *Agave angustifolia* Haw.

Aclimatación

En la etapa de aclimatación en vivero, se presentó 100 % de sobrevivencia en los tres tratamientos (Cuadro 3, Figura 4). Estos resultados concuerdan con los de Aguilar y Rodríguez (2018), quienes en la etapa de aclimatación en *A. marmorata* Roehl observaron 100 % de sobrevivencia en una mezcla de *peat moss* con agrolita y *peat moss* con arena de río. En otros estudios con agaves mexicanos (*A. cupreata*, *A. difformis*, *A. karwinskii*, *A. obscura* y *A. potatorum*) se ha obtenido un porcentaje de sobrevivencia de 53, 73, 60, 100 y 73 %, respectivamente, en un suelo comercial para macetas y arena (1:1) (Domínguez et al., 2008).

Cuadro 3. Características evaluadas en plantas de *Agave angustifolia* Haw. después de seis meses de aclimatación en vivero.

Sustrato	Altura (cm)	Diámetro del cuello (cm)	Longitud de raíz (cm)	Núm. de raíces	Materia seca (%)
T1	13±0.1ab	1.6±0.1a	17.5±0.6 a	11±1 a	15.0±1.4 ab
T2	13.6±0.5a	1.6±0.2a	17.5±0.5 a	11±2 a	17.0±0.7 a
T3	12.3±0.5b	1.3±0.1b	18.0±0.1 a	11±1 a	12.1±1.4 b

T1 = Suelo (40 %)-tepojal (30 %)-*peat moss* (30 %); T2 = Suelo (50 %)-tepojal (50 %); T3 = Suelo (40 %)-tepojal (30 %)-agrolita (30 %).



A = Suelo (40 %)-tepojal (30 %)-agrolita (30 %); B = Suelo (40 %)-tepojal (30 %)-*peat moss* (30 %); C = Suelo (50 %)-tepojal (50 %).

Figura 4. Desarrollo del *Agave angustifolia* Haw. en diferentes sustratos.

En la presente investigación se detectaron diferencias entre tratamientos con respecto a la altura, diámetro y contenido de materia seca. El uso de un mayor porcentaje de suelo en el T2 favoreció un mayor crecimiento en altura y contenido de biomasa, esto se explica por una concentración más alta de nutrientes y la retención de humedad. Además del aporte de nutrientes, la materia orgánica incrementa la porosidad del suelo, capacidad de retención de humedad y aireación (Osman, 2013). Con el sustrato

T3 se presentó el menor crecimiento en altura, diámetro del cuello y materia seca. Los materiales pétreos (agrolita y tepojal) no aportan nutrientes y retienen menor humedad, en comparación con el *peat moss*, lo cual explica el menor desarrollo en las plantas. Por esta razón, los materiales inorgánicos (tepojal, tezontle y agrolita) son más usados, individualmente, en cultivos hidropónicos (Gayosso-Rodríguez et al., 2016) donde se controla con precisión el suministro de agua y nutrientes a las plantas. En este experimento no se aplicaron nutrientes al sustrato, ello ocasionó que no se registraran diferencias en la longitud y número de raíces. Particularmente, el suministro de fósforo está relacionado con el crecimiento de la raíz (Havlin et al., 2016).

Conclusiones

Se logró generar un protocolo completo para la micropropagación de *Agave angustifolia*, desde la germinación *in vitro* hasta su aclimatación en vivero. El porcentaje de supervivencia en la etapa de aclimatación fue de 100 %, es decir, las 300 plantas obtenidas en la fase de enraizamiento se establecieron en vivero. Los ejemplares se obtuvieron a partir de la germinación de semillas, lo cual les confiere una mayor variabilidad genética, aspecto clave en la conservación de este recurso forestal. Por ello, la producción *in vitro* de *A. angustifolia* es una alternativa factible para la propagación de planta en mayor cantidad y calidad para el establecimiento de plantaciones comerciales de agave mezcalero en el Estado de México. Lo anterior, ayudará a reducir la presión que existe por la sobreexplotación de la especie en su hábitat natural.

Agradecimientos

A Probosque por proporcionar las facilidades para la ejecución del proyecto. A la División de Ingeniería Forestal del Tecnológico de Estudios Superiores Valle de Bravo (TESVB) por el apoyo en el análisis de datos del proyecto. Al Dr. Alejandro Santiago Sánchez Vélez, director general de Probosque. Al Geo. Sergio Cuevas Solórzano, jefe del departamento de apoyo a las plantaciones comerciales. A los técnicos del Laboratorio de Biotecnología Forestal. A la Dra. María Ascensión Aguilar Morales por su apoyo para el planteamiento del proyecto. A la P. de Q. A. Adriana Tinajero Martínez por el apoyo a la realización de gráficas y en la revisión de literatura. Finalmente, a la C. Simona Jiménez Salazar por su apoyo en el cuidado de la planta en invernadero y al personal técnico del Banco de Germoplasma de Probosque por la donación de la semilla.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Contribución por autor

Armandina De la Cruz-Olvera: planeación y ejecución del trabajo de laboratorio y redacción del manuscrito; Miriam Serrano-Muñoz: redacción y revisión del manuscrito; Adolfo Armando Rayas-Amor: redacción y revisión del manuscrito; René García-Martínez: análisis estadístico de datos, redacción y revisión de manuscrito.

Referencias

- Aguilar J., D., y Rodríguez de la O, J. L. (2018). Micropropagación y aclimatación de Maguey Pitzometl (*Agave marmorata* Roezl) en la Mixteca Poblana. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(2), 124-131. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77084>
- Aguilar-Rito, M. G., Arzate-Fernández, A. M., García-Núñez, H. G., y Norman-Mondragón, T. H. (2024). Establecimiento de un protocolo eficiente de desinfección *in vitro* en semillas de siete especies de *Agave* spp. *Mexican Journal of Phytopathology*, 42(1), 5. <https://www.rmfito.smf.org.mx/volumenes/4212024/articulos/5.%20RMF2310-1.%20Espa%C3%B1ol.pdf>
- Andrade D., D., Córdoba F., M. E., Criollo E., H., y Lagos B., T. C. (2013). Evaluación de medios de cultivo para propagación *in vitro* de semillas y explantes de especies silvestres de *Solanum*. *Acta Agronómica*, 62(1), 27-36. <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/37275/25153-187505-2-PB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ángeles-Espino, A., Valencia-Botín, A. J., Virgen-Calleros, G., Ramírez-Serrano, C., Paredes-Gutiérrez, L., y Hurtado-de la Peña, S. (2012). Micropropagación de agave (*Agave tequilana* Weber. var. Azul) a través de yemas axilares. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(3), 693-698. https://www.researchgate.net/publication/287187919_Micropropagation_of_agave_Agave_tequilana_Weber_var_Azul_through_axillary_buds
- Arzate-Fernández, A. M., Piña-Escutia, J. L., Norman-Mondragón, T. H., Reyes-Díaz, J. I., Guevara-Suárez, K. L., y Vázquez-García, L. M. (2016). Regeneración de agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw.) a partir de embriones somáticos encapsulados. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39(4), 359-366. <https://www.redalyc.org/journal/610/61049142004/html/>

Aureoles-Rodríguez, F., Rodríguez-de la O., J. L., Legaria-Solano, J. P., Sahagún-Castellanos, J., y Peña O., M. G. (2008). Propagación *in vitro* del 'Maguey bruto' (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada de interés económico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14(3), 263-269. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2008000300006

Ávila-Lara, D. D., González-Montemayor, Á. M., Espinoza-Arellano, J. de J., Flores-Gallegos, A. C., y Rodríguez-Herrera, R. (2021). Rentabilidad de la producción de aguamiel en el sureste del estado de Coahuila, México: Un estudio de caso. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 29(82), 61-71. <https://www.redalyc.org/journal/674/67470553007/67470553007.pdf>

Barrientos R., G., Esparza I., E. L., Segura P., H. R., Talavera M., Ó., Sampedro R., M. L., y Hernández C., E. (2019). Caracterización morfológica de *Agave angustifolia* y su conservación en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(3), 655-668. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i3.1554>

Bautista-Castellanos, A. I., Enríquez-del Valle, J. R., Velasco-Velasco, V. A., y Rodríguez-Ortiz, G. (2020). Enraizado de brotes *in vitro* y aclimatación de plantas de *Agave potatorum* Zucc. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 7(3), Artículo e2618. <https://doi.org/10.19136/era.a7n3.2618>

Chávez-Ortiz, L. I., Morales-Domínguez, J. F., Rodríguez-Sahagún, A., & Pérez-Molphe-Balch, E. (2021). *In vitro* propagation of *Agave guiengola* Gentry using semisolid medium and temporary immersion bioreactors. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 90(3), 1003-1013. <https://doi.org/10.32604/phyton.2021.012862>

Correa-Hernández, L., Baltazar-Bernal, O., Sánchez-Páez, R., y Bello-Bello, J. J. (2022). *In vitro* multiplication of agave tobala (*Agave potatorum* Zucc.) using Ebb-and-Flow biorreactor. *South African Journal of Botany*, 147, 670-677. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.03.009>

Cruz G., H., Campos Á., G. V., Enríquez del V., J. R., Velasco V., V. A., y Rodríguez O., G. (2017). Senescencia foliar en plantas micropropagadas de *Agave americana*

- durante su aclimatación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(2), 381-391.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v8i2.58>
- Domínguez R., M. S., Alpuche S., A. G., Vasco M., N. L., y Pérez M. B., E. (2008). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4), 317-322.
<https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/31-4/3a.pdf>
- Enríquez del V., J. R., Carrillo C., G., y 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.
<https://www.redalyc.org/pdf/610/61028212.pdf>
- Faisal, M., Ahmad, N., Anis, M., Alatar, A. A., & Qahtan, A. A. (2018). Auxin-cytokinin synergism *in vitro* for producing genetically stable plants of *Ruta graveolens* using shoot tip meristems. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(2), 273-277.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.09.009>
- Fatima, N., Ahmad, N., & Anis, M. (2011). Enhanced *in vitro* regeneration and change in photosynthetic pigments, biomass and proline content in *Withania somnifera* L. (Dunal) induced by copper and zinc ions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(12), 1465-1471. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.08.011>
- Fragoso-Gadea, T., Gutiérrez, A., Coronado, M. L., Terrazas, T., Ramos-Clamont, G., Vázquez-Moreno, L., Álvarez-Bajo, O., y Esqueda, M. (2021). Poblaciones silvestres de *Agave angustifolia* (Asparagaceae) de Sonora, México: variación morfológica y contenido de azúcares. *Acta Botánica Mexicana*, (128), Artículo e1889.
<https://doi.org/10.21829/abm128.2021.1889>
- Garriga C., M., González O., G., Alemán G., S., Abreu C., E., Quiroz B., K., Caligari, P. D. S., & García-González, R. (2010). Management of auxin-cytokinin interactions to improve micropropagation protocol of henequen (*Agave fourcroydes* Lem.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70(4), 545-551.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392010000400003>

Gayosso-Rodríguez, S., Borges-Gómez, L., Villanueva-Couoh, E., Estrada-Botello, M. A., y Garruña-Hernández, R. (2016). Sustratos para producción de flores. *Agrociencia*, 50(5), 617-631. <https://www.agrociencia-colpos.org/index.php/agrociencia/article/view/1237/1237>

Havlin, J. L., Tisdale, S. L., Nelson, W. L., & Beaton, J. D. (2016). *Soil fertility and fertilizers. An introduction to nutrient management*. Pearson India. https://www.researchgate.net/publication/366175716_Soil_Fertility_and_Fertilizers_by_John_L_Havlin_z-liborg

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2019). *Conjunto de datos vectoriales de información topográfica E14A58 (Tenancingo) escala 1:50 000 serie III. Mex. Mapas Topográficos. Escala 1:50 000. Serie III. México.* https://datos.gob.mx/busca/dataset/mapas-topograficos-escala-1-50-000-serie-iii-mexico/resource/dcfed692-f291-4db3-9c9c-e5d6175b9476?inner_span=True

International Seed Testing Association. (2025). Chapter 2: Sampling. In ISTA (Edit.). *International Rules for Seed Testing* (Vol. 2025, pp. 1-48). ISTA. <https://www.seedtest.org/api/rm/97C62HX4T55R346/ista-rules-2025-02-sampling-web.pdf>

León V., N. I., Campos Á., G. V., Enríquez-del Valle, J. R., Velasco V., V. A., Marini Z., F., y Rodríguez O., G. (2013). Diversidad de especies de agave en San Miguel Tilquiapam, Ocotlán, Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (6), 1185-1195. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i6.1282>

Luna-Luna, S., Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., Carrillo-Rodríguez, J. C., y Velasco-Velasco, V. A. (2017). Anatomía y morfología de plantas micropropagadas-aclimatadas de *Agave potatorum* Zucc. fertirrigadas en vivero. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(4), 491-494. <https://doi.org/10.35196/rfm.2017.4.491-494>

Mandujano B., A., Pons H., J. L., Paredes M., R., y García M., P. (2018). Diversidad genética de maguey (*Agave* spp.) en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(3), 511-523. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i3.1212>

Miguel L., M. E., Enríquez-del Valle, J. R., Velasco V., V. A., Villegas A., Y., Carrillo R., J. C., y Rodríguez O., G. (2013). Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de *Agave*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (6), 1151-1159. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i6.1279>

Miguel-Luna, M. E., González-Zafra, E. E., Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., y de los Santos-Romero, R. B. (2023). Bencilaminopurina y sales minerales para la propagación *in vitro* de brotes de *Agave nussaviorum*. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 10(S1), 3.

<https://revistaremaeitvo.mx/index.php/remae/article/view/53/45>

Monja-Mio, K. M., Barredo-Pool, F., Herrera H., G., Esqueda V., M., & Robert, M. L. (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. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.032>

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

NOM-059-SEMARNAT-2010. (2010, 26 de noviembre). NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, Segunda Sección, de 30 de diciembre de 2010.

<http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/DO2454.pdf>

Osman, K. T. (2013). *Soils. Principles, properties and management*. Springer. https://books.google.com.mx/books?id=pZ0rVya6CW4C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Pasternak, T. P., & Steinmacher, D. (2024). Plant growth regulation in cell and tissue culture *in vitro*. *Plants*, 13(2), 327. <https://doi.org/10.3390/plants13020327>

Pérez M. B., E., Esparza A., M. J., y Pérez R., M. E. (2012). Conservación *in vitro* de germoplasma de *Agave* spp. bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista*

- Fitotecnia Mexicana*, 35(4), 279-287.
<https://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v35n4/v35n4a4.pdf>
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A., & Rodríguez-Garay, B. (2007). Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar Azul. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(6), 569-575.
<https://doi.org/10.1007/s11627-007-9046-5>
- Quinn, G. P., & Keough, M. J. (2002). *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press.
<https://www2.ib.unicamp.br/profs/fsantos/apostilas/Quinn%20&%20Keough.pdf>
- Ramírez-Malagón, R., Borodanenko, A., Pérez-Moreno, L., Salas-Araiza, M. D., Nuñez-Palenius, H. G., & Ochoa-Alejo, N. (2008). *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94, 201-207. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9405-x>
- Ríos-Ramírez, S. C., Enríquez-del Valle, J. R., Rodríguez-Ortiz, G., & Ruíz-Luna, J. (2017). Benzylaminopurine and indol-3-acetic acid concentrations in *in vitro* proliferation of *Agave angustifolia* adventitious shoots. *Ciencia e Investigación Agraria*, 44(3), 285-294. <http://dx.doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1810>
- Rivera, J. L. y Lima, E. (2013). Efecto desorbedor del metanol en la membrana celular. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 93-97.
<https://www.scielo.org.mx/pdf/tip/v16n2/v16n2a2.pdf>
- Santacruz-Ruvalcaba, F., Castañeda-Nava, J. J., Villanueva-González, J. P., García-Sahagún, M. L., Portillo, L., y Contreras-Pacheco, M. L. (2022). Micropropagación de *Agave maximiliana* Baker por proliferación de yemas axilares. *Polibotánica*, (54), 139-151. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.54.9>
- Santíz, J. A., Rincón-Rosales, R., y Gutiérrez-Miceli, F. A. (2012). Propagación *in vitro* de *Agave grijalvensis* B. Ullrich, una especie endémica de Chiapas bajo protección especial. *Gayana Botánica*, 69, 23-30.
http://www2.udec.cl/~gvalencia/pdf/GB2012_69_ne_Santiz_etal.pdf

Schenk, R. U., & Hildebrandt, A. C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50(1), 199-204. <https://doi.org/10.1139/b72-026>

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2014). Especies de flora prioritarias para la conservación, 2014 (Número). *Compendio de estadísticas ambientales* 2018.

https://apps1.semarnat.gob.mx:8443/dgeia/compendio_2018/dgeiawf.semarnat.gob.mx_8080/ibi_apps/WFServlet9529.html

Statistical Analysis System Institute. (2013). *Base SAS® 9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures*. SAS Institute Inc. https://books.google.com.pa/books?id=M0TawAEACAAJ&hl=es&source=gbs_book_other_versions

Suárez P., I. E. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/entities/publication/800256e3-9997-4159-aae4-a0a2c5522852>

Téllez T., A. G., Jiménez R., J. Á., González C., O., Juárez P., W. R., Martínez M., S., y Chávez Á., V. M. (2023). Cultivo *in vitro* de *Agave potatorum*, especie amenazada endémica de México. *Botanical Sciences*, 101(3), 883-894. <https://doi.org/10.17129/botsci.3279>

Zhang, Y. M., Li, X., Chen, Z., Li, J. F., Lu, J. Y., & Zhou, W. Z. (2013). Shoot organogenesis and plant regeneration in *Agave* hybrid, No. 11648. *Scientia Horticulturae*, 161, 30-34. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.06.047>



Todos los textos publicados por la **Revista Mexicana de Ciencias Forestales** –sin excepción– se distribuyen amparados bajo la licencia *Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional)*, que permite a terceros utilizar lo publicado siempre que mencionen la autoría del trabajo y a la primera publicación en esta revista.