

Propagación *in vitro* de *Agave grijalvensis* B.Ullrich, una especie endémica de Chiapas bajo protección especial

In vitro propagation of *Agave grijalvensis* B.Ullrich, an endemic species from Chiapas under special protection

JOSÉ ALFREDO SANTÍZ, REINER RINCÓN-ROSALES & FEDERICO ANTONIO GUTIÉRREZ-MICELI*

Departamento de Ing. Química y Bioquímica, Instituto Tecnológico de Tuxtla-Gutiérrez, Carr. Panamericana km 1080, Tuxtla-Gutiérrez, Chiapas, México.

*fgmiceli@gmail.com

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo para inducir embriogénesis somática y posterior re-diferenciación en *Agave grijalvensis* para preservar la especie. Para la inducción de la embriogénesis se utilizó un diseño experimental multifactorial categórico para evaluar la Capacidad de Formación de Embriones (EFC) a partir de cultivo de callos, empleando tres reguladores de crecimiento: BA, ANA y 2,4-D, a diferentes concentraciones. Los resultados obtenidos a las 8 semanas de incubación demostraron que BA y el 2,4-D tuvieron efecto significativo ($p < 0,05$) sobre la EFC. Los embriones obtenidos fueron separados del callo y transferidos a medio MS nuevo en donde se evaluó el efecto del BA sobre la Capacidad de Generar Brotes (BFC), para ello se utilizó un diseño experimental simple de un solo factor para evaluar 3 diferentes concentraciones de BA: 1, 22 y 44 μM ; la mayor BFC se observó a las 8 semanas de incubación; sin embargo, no hubo diferencias entre las tres concentraciones ($p < 0,05$). Los brotes obtenidos se utilizaron para inducir el enraizamiento evaluando dos factores, el regulador de crecimiento AIB a 0, 10, 20, 30 y 40 μM y el medio MS al 50 y 100% de sales, encontrándose que por sí solo cada factor evaluado no tuvo efectos significativos ($p < 0,05$), pero si su interacción. El medio de cultivo más adecuado para el enraizamiento fue el medio MS al 50% de sus sales, sin adición de AIB. Las plántulas fueron aclimatadas en invernadero con un 100% de sobrevivencia.

PALABRAS CLAVE: Callos, *Agave grijalvensis*, propagación, aclimatación.

ABSTRACT

The objective of this research was to establish a protocol for inducing somatic embryogenesis and subsequent re-differentiation in *Agave grijalvensis* to preserve the specie. For induction of embryogenesis, we used a categorical multifactorial experimental design to evaluate the embryo formation capacity (EFC) using three growth regulators: BA, NAA and 2.4-D with three different concentrations. The results after 8 weeks of incubation showed that BA and 2,4-D influenced significantly ($p < 0.05$) on the EFC. The embryos were separated from the callus and transferred to new MS medium where they assessed the effect of BA on buds formation capacity (BFC), for this purpose, an experimental design of a single factor to evaluate three different concentrations of BA (1, 22 and 44 μM) was implemented. Highest value of BFC was observed at 8 weeks of incubation; however, significant differences ($p < 0.05$) between the three BA concentrations were not found. The seedlings obtained were used to induce rooting evaluating two factors, the growth regulator IBA at 0, 10, 20, 30 and 40 μM and the MS at 50 and 100% strength, so that for each factor tested alone had no significant effect ($p < 0.05$), but if its interaction. The best treatment was that MS medium containing 50% of their salts without AIB addition. The plantlets were acclimatized in a greenhouse with 100% survival.

KEYWORDS: Calluses, *Agave grijalvensis*, propagation, acclimatation.

INTRODUCCIÓN

Los agaves son uno de los grupos vegetales más representativos de México. Su importancia va desde su valor ecológico y económico hasta su aspecto cultural.

Desafortunadamente, muchas especies de este grupo han sido descuidadas desde los puntos de vista del mejoramiento, explotación racional y conservación. Según

la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL- 2001 *Agave grijalvensis* B.Ullrich es una especie endémica de Chiapas que se encuentra bajo protección especial. En este sentido, la biotecnología vegetal puede aportar herramientas valiosas que permitan el mejor aprovechamiento de estas plantas y aseguren al mismo tiempo su conservación. En el género *Agave* se ha reportado embriogénesis somática directa en *A. victoria-reginae* T.Moore (Rodríguez-Garay *et al.* 1996), organogénesis indirecta y embriogénesis somática indirecta en *A. tequilana* F.A.C.Weber var. azul (Valenzuela-Sánchez *et al.* 2006, Portillo *et al.* 2007) respectivamente; así como embriogénesis en *A. vera-cruz* Mill. (Tejavathi *et al.* 2007) entre otros. En *A. grijalvensis* se ha logrado la propagación *in vitro* a partir de semillas (Sánchez *et al.* 2008). La embriogénesis somática está ampliamente considerada como la mejor vía de regeneración que utiliza las técnicas de cultivo de tejidos vegetales en biotecnología vegetal. La embriogénesis somática es un proceso biológico a partir del cual una célula o un grupo de células somáticas se comportan como un cigoto, originando un embrión que posteriormente formará una planta.

El objetivo de esta investigación fue establecer un protocolo para inducir embriogénesis somática y posterior re-diferenciación en *Agave grijalvensis*, de forma secuencial se determinó la influencia de los reguladores de crecimiento sobre la inducción de embriogénesis somática en callos, posteriormente se indujo la re-diferenciación de los embriones para producir plántulas, para su enraizamiento se evaluó el efecto de la concentración de sales MS y ácido indol butírico (AIB), finalmente las plántulas obtenidas fueron aclimatadas en invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron callos producidos de acuerdo a la metodología reportada por Sánchez *et al.* (2008). Los callos fueron multiplicados cada cuatro semanas utilizando frascos magenta de cultivo con capacidad de 0,5 l, conteniendo 0,025 l de medio MS (Murashige & Skoog 1962), suplementado con 0,1 g.l⁻¹ de mioinositol, 0,05 g.l⁻¹ de fosfato de sodio, 30 g.l⁻¹ de sacarosa, 0.18 µM de 2,4-D y 2,5 g.l⁻¹ de phytigel® como gelificante. El pH del medio se ajustó a 5,7 ± 1, se esterilizó con calor húmedo en autoclave a 121 °C por 15 min a 15 lbpulg⁻².

INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS

Para los estudios de inducción de embriogénesis somática en medio MS se utilizó un diseño experimental multifactorial categórico 3x 4 x 4, para evaluar el efecto de tres reguladores de crecimiento: BA (0, 22 y 44 µM), ANA (0; 1,3; 2,6 y 5,2 µM) y 2,4-D (0; 0,55; 1,1 y 2.2 µM), obteniendo 48

tratamientos con tres repeticiones cada uno. La variable de respuesta fue la capacidad de formación de embriones “EFC” (EmbryoFormingCapacity) (Valenzuela *et al.* 2006), que se calculó de la siguiente manera:

$$EFC = \frac{(\text{Promedio de embriones por callo}) * (\% \text{ de callos que formaron embriones})}{100}$$

Los embriones obtenidos fueron separados del callo y transferidos a medio MS nuevo en donde se evaluó el efecto del BA sobre la capacidad de generar brotes “BFC” (Bud Forming Capacity) (Valenzuela *et al.* 2006), para lo cual se utilizó un diseño experimental simple de un solo factor para evaluar 3 diferentes concentraciones de BA: 11, 22 y 44 µM, y determinar una concentración óptima que genere un número elevado de brotes. El cálculo de la “BFC” fue como sigue:

$$BFC = \frac{(\text{Promedio de brotes por embrión}) * (\% \text{ de embriones que formaron brotes})}{100}$$

ENRAIZAMIENTO

Para la obtención de raíces en las plántulas se utilizó un diseño experimental multinivel factorial 5 x 2 evaluando dos factores (Sánchez *et al.* 2008): el AIB (Ácido Indol-3-Butírico) a 0, 10, 20, 30 y 40 µM, y el medio MS al 50% y 100% de sus sales (Sánchez *et al.* 2008). En total se obtuvieron 10 tratamientos con 5 repeticiones cada uno. Todos los diseños experimentales llevados a cabo en esta investigación se analizaron estadísticamente mediante el software Statgraphics plus 5.1 ®.

ACLIMATACIÓN

Una vez finalizada la evaluación de la formación de raíces, se procedió a la aclimatación de estas plántulas. Para esto, las plántulas se retiraron del medio de cultivo, se enjuagaron con agua destilada y se sumergieron en una solución de captan® (2 g.l⁻¹) y agrimicyn® (3 g.l⁻¹) durante 10 min. Las plántulas se sembraron en semilleros para invernadero de 55 cavidades, los cuales contenían Peat-most como sustrato; se colocaron en una cámara con control de temperatura a 22 ± 2°C y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad durante 4 semanas. Después de este periodo las plántulas aclimatadas se transfirieron a macetas de 15 cm de diámetro con Peat-moss y se colocaron en invernadero.

RESULTADOS

Los callos de *A. grijalvensis* formaron embriones después de 8 semanas de incubación en medio MS sin presentar necrosamiento u oxidación. En la Tabla I se presentan los resultados obtenidos con los diferentes tratamientos para evaluar los efectos individuales de BA, 2,4-D y ANA y de

las interacciones entre estos reguladores. Se observó que si la concentración de auxinas (ANA, 2,4-D) es superior a la de citocinina (BA), la EFC disminuye, y cuando la concentración de BA es alta respecto a la concentración de auxinas, la EFC incrementa. Con estos resultados se realizó el análisis de varianza (Tabla II), donde se observa que BA y 2,4-D tuvieron un efecto significativo ($p < 0,05$), mientras que ANA no lo tuvo. La interacción que tuvo efecto significativo fue la de 2,4-D x ANA. Los embriones somáticos fueron variables ya que se presentaron en diferentes formas y tamaños (Fig. 1). Estos resultados demuestran que las auxinas restringen la formación de embriones en callos embriogénicos, pero inducen la generación de callo embriogénico en explantes vírgenes, por ello la auxina 2,4-D se emplea básicamente para la etapa de inducción de callos embriogénicos; en tanto que la citocinina BA es el factor que permite la diferenciación de embriones. En los experimentos para la obtención de brotes, se encontró que la concentración de 22 μM de BA indujo la producción de un mayor número de brotes al obtenerse un promedio de 6 brotes, en tanto que 44 μM de BA reduce la formación de brotes a 4 (Fig. 2) Valenzuela *et al.* (2006) reportaron que a 44 μM de BA se generan 14,5 brotes en *A. tequilana*, en tanto que a 22 μM la formación de brotes es baja. Los brotes obtenidos presentaron la formación

de plántulas a las 5 semanas de incubación. Las primeras plántulas de *A. grijalvensis* iniciaron el desarrollo de raíces a las 2 semanas de incubación y a las 8 semanas presentaron un número elevado de raíces (Fig. 3). El enraizamiento de los brotes generados se logró con los valores más altos en medio MS al 50% de sus sales, obteniéndose en promedio 9,0 y 8,2 raíces en los tratamientos sin y con 30 μM de AIB respectivamente (Tabla III), siendo el primero más atractivo desde el punto de vista económico. También hubo efecto estadístico significativo cuando los factores evaluados interactúan entre sí como se muestra en la Tabla IV. Esta tabla permite observar que no existen efectos estadísticos significativos cuando se evalúan por separado los factores AIB y MS ya que ningún valor de p es menor o igual a 0,05. Cuando se evalúan las interacciones entre estos dos factores hay efecto estadístico significativo en el número de raíces formadas, esto indica que las interacciones o tratamientos con estos dos factores repercuten en una mayor formación de raíces. En cuanto a la aclimatación, la primera generación de plántulas obtenidas en esta investigación se enraizó y colocó en semilleros con Peat-most; el 100% se aclimataron después de 4 semanas, incubadas en una cámara bioclimática.

TABLA I. Efecto de los reguladores de crecimiento BA, ANA y 2,4-D sobre la capacidad de formación de embriones (EFC) en callos de *Agave grijalvensis*.

TABLE I. Effect of growth regulators BA, NAA and 2.4-D on embryo formation capacity (EFC) from callus of *Agave grijalvensis*.

TRATAMIENTO	BA	2,4-D	ANA	EMBRIONES	EFC
	————— μM —————				
1	0	0	0	0	0
2	0	0	1,3	2	0,68
3	0	0	2,6	0,5	0,170
4	0	0	5,2	0	0
5	0	0,55	0	0	0
6	0	0,55	1,3	1,5	0,51
7	0	0,55	2,6	0	0
8	0	0,55	5,2	0	0
9	0	1,1	0	1	0,34
10	0	1,1	1,3	0	0
11	0	1,1	2,6	0	0
12	0	1,1	5,2	1	0,34
13	0	2,2	0	0	0
14	0	2,2	1,3	1	0,34
15	0	2,2	2,6	2,5	0,85
16	0	2,2	5,2	0	0
17	22	0	0	1,5	0,51
18	22	0	1,3	1	0,34
19	22	0	2,6	4,5	1,53
20	22	0	5,2	0,33	0,11
21	22	0,55	0	1,5	0,51
22	22	0,55	1,3	1	0,34
23	22	0,55	2,6	3	1,02
24	22	0,55	5,2	0	0

TABLA II. Análisis de varianza del efecto de reguladores de crecimiento vegetal sobre la EFC en cultivo de callos de *Agave grijalvensis*.

TABLE II. Variance analysis of the effect of plant growth regulators on the EFC in callus culture of *Agave grijalvensis*.

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	Gl	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE-F	P-VALOR
EFECTOS PRINCIPALES					
a: BA	1,79952	2	0,899759	6,78	0,006
b: 2,4-D	1,25078	3	0,416926	3,14	0,05
c: ANA	0,25222	3	0,0840733	0,63	0,60
INTERACCIONES					
a*b	1,40338	6	0,233896	1,76	0,16
a*c	1,70583	6	0,284305	2,14	0,09
b*c	2,80776	9	0,311973	2,35	0,05
Residuos	2,38762	18	0,132645	-	-
Total corregido	11,6071	47	-	-	-

TABLA III. Efecto del AIB y del medio MS sobre el número de raíces por plántula.

TABLE III. Effect of IBA and MS media on the number of roots per plantlet.

TRATAMIENTO	AIB — μmol —	MS (%)	NÚMERO DE RAÍCES POR PLÁNTULA
1	0	50	9,0 \pm 0,9 a
2	10	50	2,0 \pm 0,9 ab
3	20	50	1,0 \pm 0,5 b
4	30	50	8,2 \pm 1,6 a
5	40	50	2,2 \pm 1,3 ab
6	0	100	0,0 \pm 0,0 b
7	10	100	2,4 \pm 1,3 ab
8	20	100	3,0 \pm 2,3 ab
9	30	100	2,8 \pm 1,3 ab
10	40	100	5,8 \pm 2,7 ab
DMS(p<0,05)			7,04

TABLA IV. Análisis de varianza ANOVA del efecto del AIB y del medio MS sobre el número de raíces.

TABLE IV. Analysis of variance ANOVA of the effect of IBA and MS medium on the number of roots.

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	Gl	CUADRADO MEDIO	COEFICIENTE-F	P-VALOR
EFECTOS PRINCIPALES					
a: AIB	90,92	4	22,73	2,06	0,10
b: MS	35,28	1	35,28	3,19	0,08
INTERACCIONES					
a*b	282,92	4	70,73	6,40	0,0004
Residuos	442,4	40	11,06	-	-
Total (corregido)	851,52	49	-	-	-

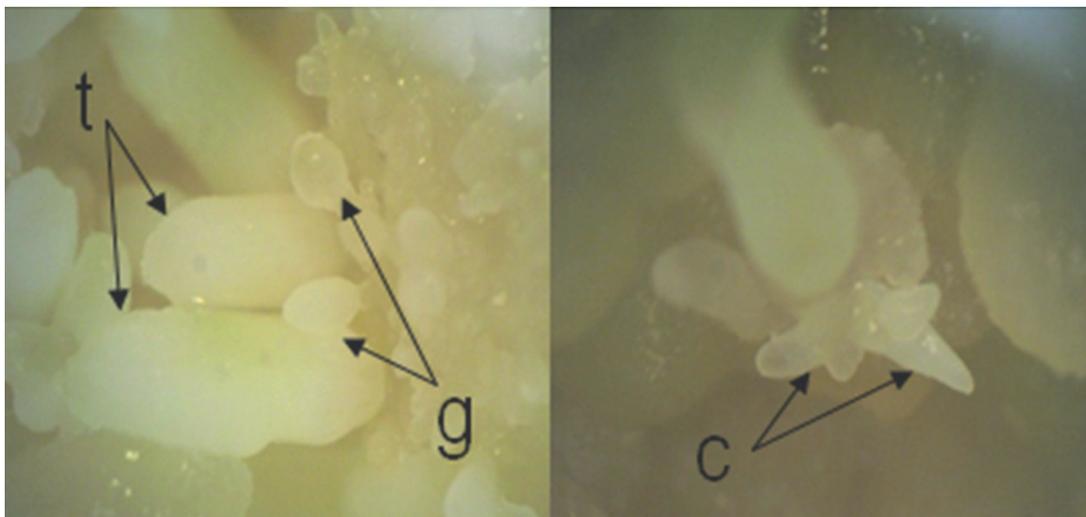


FIGURA 1. Embriones somáticos de *Agave grijalvensis*, embriones en estado globular (g) y torpedo (t), embriones en estado de corazón (c).

FIGURE 1. Somatic embryos of *Agave grijalvensis*, embryos in globular-stage (g) and torpedo-stage (t), heart-stage embryos (c).

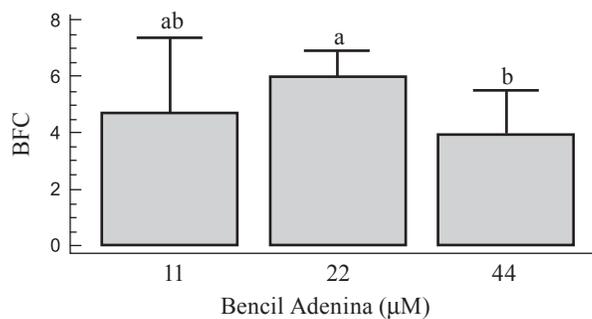


FIGURA 2. Efecto de la bencil adenina en la BFC (capacidad de formación de brotes) a partir del cultivo de callos de *Agave grijalvensis*.

FIGURE 2. Bencil adenine effect on BFC (Bud Forming Capacity) from callus culture of *Agave grijalvensis*.



FIGURA 3. Plántulas de *Agave grijalvensis* a las 8 semanas de incubación completamente enraizadas.

FIGURE 3. *Agave grijalvensis* plantlets at 8 weeks of incubation completely rooted.

DISCUSIÓN

La regeneración *in vitro* a través de la obtención de embriones, brotes y plántulas a partir de embriogénesis somática indirecta, implica el uso de reguladores de crecimiento específicos en cada protocolo de regeneración, de la misma manera, el medio MS es ampliamente usado como soporte de los cultivos *in vitro* en múltiples investigaciones. Los resultados en la propagación mediante embriogénesis somática de *A. grijalvensis* sugieren que la presencia de 2,4-D a concentración elevada disminuye la formación de embriones, mientras que la de ANA no afecta significativamente la presencia de embriones y BA desempeña el papel más importante en la formación de embriones. En *A. tequilana*, se ha sugerido la importancia del 2,4-D en el desempeño de la embriogénesis somática ya que la presencia de auxinas genera respuestas positivas en la formación de embriones (Portillo *et al.* 2007). La inducción de la embriogénesis en callos de *A. grijalvensis*

se llevó a cabo mediante el efecto del 2,4-D, por lo que se resalta la importancia de los reguladores del crecimiento en este proceso, donde el tipo de regulador de crecimiento, la concentración en el medio de cultivo y la duración de la fase de inducción juegan un papel importante. Se ha reportado que el 2,4-D es la auxina más eficiente y la más comúnmente usada para la inducción de la embriogénesis somática ya que: 1) estimula una rápida división celular; 2) estimula una división celular sincronizada que da como resultado células pro-embriogénicas y 3) estimula la proliferación de células pro-embriogénicas (Lintz *et al.* 1998). La diferenciación depende de la interacción cuantitativa entre auxinas y citocininas: un balance a favor de las auxinas estimula la formación de callos, mientras un balance a favor de las citocininas estimula la formación de embriones y brotes, además, la aparición de nuevos embriones no es un proceso sincrónico por lo que en un mismo callo embriogénico es posible observar varios estados de desarrollo del embrión (Arnold *et al.* 2002). En esta investigación la diferenciación

de callos de *Agave grijalvensis* fue posible mediante embriogénesis somática, en donde el factor determinante en la formación de embriones es la presencia de BA ya que genera una mejor producción de embriones. Fue posible llevar a cabo la embriogénesis somática de *A. grijalvensis* a nivel *in vitro*, teniendo como primera etapa la inducción de callos con 2,4-D y la formación de embriones y brotes con BA a 22 μ M. Valenzuela *et al.* (2006) reportaron que al aumentar la concentración de ANA la BFC aumenta, mientras que al incrementar la concentración de 2,4-D la BFC disminuye; sin embargo la combinación entre BA/ANA y BA/2,4-D incrementa la BFC. Los brotes y plántulas en los procesos de cultivo *in vitro* frecuentemente generan raíces aun sin la necesidad de agregar alguna auxina, lo cual indica que cualquier necesidad que puedan tener de este tipo de hormonas es complementada por su capacidad de sintetizarla (Salisbury & Ross 1994), esto explica el enraizamiento de *A. grijalvensis* en medio MS al 50% de sales sin la adición de AIB. Resultados similares se han reportado para *A. arizonica* (Powers & Backhaus 1989), *A. parrasana* (Santacruz-Ruvalcaba *et al.* 1999) y *A. victoria-reginae* (Martínez-Palacios *et al.* 2003), que mostraron altas tasas de enraizamiento sin necesidad de adicionar auxinas. Solamente en *A. angustifolia* se ha recomendado el uso de AIB para inducir el enraizamiento *in vitro* (Enríquez del Valle *et al.* 2005) y en *A. salmiana* la auxina recomendada para el enraizamiento es el AIA (Silos-Espino *et al.* 2007). Los reguladores endógenos de crecimiento están presentes en la planta durante todo su ciclo de vida pero su concentración fluctúa; varía en función del estado fisiológico de la planta y en cada uno de los órganos de ésta. El ácido indolacético (AIA) se encuentra presente de manera natural en las plantas, esto podría explicar la aparición temprana de raíces en las plántulas, ya que se encontraban en un estado de crecimiento avanzado, sin embargo, en el tratamiento 6 de enraizamiento con 100% de sales MS sin AIB, ningún brote generó raíces (Tabla III), lo cual podría deberse a la hiperhidricidad que presentaron los brotes en este tratamiento y a la ausencia de AIB. La hiperhidricidad o vitrificación (Debergh *et al.* 1992) es un serio problema que afecta a varias plantas que son cultivadas *in vitro*. Los tejidos hiperhídricos se caracterizan por una apariencia vidriosa, tallos y hojas traslúcidas y una distorsión de sus órganos (Brand 1993). El desarrollo y supervivencia de cultivos hiperhídricos es muy bajo. Se ha descrito que la hiperhidricidad está asociada con varios factores del medio del cultivo, incluyendo la baja concentración de agente gelificante, altas concentraciones de citocininas y la presencia de alguno de los nutrientes del medio de cultivo. En general, estos resultados son similares a los reportados por Sánchez *et al.* (2008) en *Agave grijalvensis*, ya que de igual manera obtienen raíces en medio MS sin reguladores de crecimiento. Los resultados del enraizamiento demostraron que los brotes de *Agave grijalvensis* dependieron de la concentración de sales

MS más que del AIB ya que el enraizamiento fue óptimo en medio MS al 50% de sus sales. El establecimiento *ex vitro* o etapa de adaptación demuestra la eficiencia de un sistema de micropropagación ya sea por vía embriogénica u organogénica, ya que una u otra vía de regeneración puede ser muy productiva, pero poco serviría si el porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* de plantas es bajo. El 100% de plántulas de *A. grijalvensis* se aclimató a condiciones *ex vitro*; estas plántulas se aclimataron en una primera etapa en cámara bioclimática con el fin de reducir la pérdida de humedad y posteriormente se trasladaron a invernadero.

En conclusión es posible afirmar que la embriogénesis somática establecida en el protocolo de micropropagación es una herramienta biotecnológica adecuada para la micropropagación y el rescate de *Agave grijalvensis*. Por ello el uso de la embriogénesis somática para la propagación seguirá aumentando según haya protocolos más avanzados y refinados capaces de producir embriones morfológicamente normales, sin variación somaclonal y con capacidad para germinar y convertirse en plantas.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Educación Superior Tecnológica por el financiamiento otorgado a este proyecto bajo el nombre de: Micropropagación de plantas endémicas de Chiapas y en peligro de extinción o amenazadas evaluando su variabilidad genética (595.07-P).

BIBLIOGRAFÍA

- ARNOLD, S., I. SABALA, P. BOZHOKOV, J. DYACHOK & L. FILONOVA. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 233-249.
- BRAND, M.H. 1993. Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 35: 203-209.
- DEBERGH, P.C., J. AITKEN-CHRISTIE, D. COHEN, B. GRUT, S. VON ARNOLD, R. ZIMMERMAN, & M. ZIV. 1992. Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 30: 135-140.
- ENRÍQUEZ DEL VALLE, J.R., G. CARRILLO-CASTAÑEDA & J.L. RODRÍGUEZ DE LA O. 2005. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 28: 175-178.
- LITZ, R.E., R.C. HENDRIX, P.A. MOON & V.M. CHÁVEZ. 1998. Induction of embryogenic mango cultures as affected by genotype, explanting, 2,4-D and embryogenic nurse culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 13-18.
- MARTÍNEZ-PALACIOS, A., M.P. ORTEGA-LARROCEA, V.M. CHÁVEZ & R. BYE. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 74: 135-142.

- MURASHIGE, T. & F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-493.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-ECOL-2001, 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. 2ª sección.
- PORTILLO, M.L., F. SANTACRUZ-RUVALCABA, A. GUTIÉRREZ-MORA & B. RODRÍGUEZ-GARAY. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilaza* Weber cultivar Azul. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 43: 569-575.
- POWERS, D.E. & R.A. BACKHAUS. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 16: 57-60.
- RODRÍGUEZ-GARAY, B., M.A. GUTIÉRREZ & D.B. ACOSTA. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 46: 85-87.
- SALISBURY, B.F. & W.C. ROSS. 1994. Fisiología vegetal. Ed. Iberoamericana. 4ª edición. México, D.F. 759 pp.
- SÁNCHEZ-URBINA A., L.M.C. VENTURA-CANSECO, T.R. AYORA-TALAVERA, M. ABUD-ARCHILA, M.A. PÉREZ-FARRERA, L. DENDOOVEN & F.A. GUTIERREZ-MICELI. 2008. Seed germination and *in vitro* propagation of *Agave grijalvensis* an endemic endangered Mexican species. *Asian Journal of Plant Sciences* 7: 752-756.
- SANTACRUZ-RUVALCABA, F., P.H. GUTIÉRREZ & G.B. RODRÍGUEZ. 1999. Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 56:163-167.
- SILOS-ESPINO, H., C.N. GONZÁLEZ, L.A. CARRILLO, L.F. GUEVARA, G. M.E. VALVERDE & O. PAREDES. 2007. Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* Gentry. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 82: 355-359.
- TEJAVATHI, D.H., M.D. RAJANNA, R. SOWMYA & K. GAYATHRAMMA. 2007. Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 43: 423-428.
- VALENZUELA-SÁNCHEZ, K.K., H.R.E. JUÁREZ, H.A. CRUZ, P.V. OLALDE, M.E. VALVERDE & O. PAREDES. 2006. Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 42: 336-340.

Recibido: 16.10.10
Aceptado: 11.12.10