

CAPACIDAD EMBRIOGÉNICA DE CALLOS INDUCIDOS EN EJES EMBRIONARIOS CIGÓTICOS DE *Agave angustifolia* Haw

EMBRYOGENIC CAPACITY OF INDUCED CALLI ON ZYGOTIC EMBRYONIC AXIS OF *Agave angustifolia* Haw

Amaury-Martín Arzate-Fernández^{1*} y Rafael Mejía-Franco¹

¹Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma del Estado de México-Campus "El Cerrillo". Carretera Toluca-Ixtlahuaca, km 11.5 entronque al Cerrillo Piedras Blancas. 50200, Toluca, Estado de México. Tel. 01 (722) 296 5516, 296 5529, 296 5531, Ext. 144.

*Autor para correspondencia: (amaury1963@yahoo.com.mx)

RESUMEN

El uso como explantes de ejes embrionarios cigóticos de semillas de agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw), permitió inducir embriones somáticos (ES) *in vitro*, previa formación de callos embriogénicos. Se probaron dos concentraciones de las sales Murashige y Skoog (MS), 25 y 100 % de la original (MS-25 y MS-100), combinados con 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), con 0.0 y 1.0 mg L⁻¹ de 6-benciladenina (BA), y con 30 y 60 g L⁻¹ de sacarosa. La mitad de los tratamientos fueron incubados bajo un fotoperíodo de 16 h luz (38 μmol m⁻² s⁻¹) y 8 h de oscuridad, y la otra mitad en completa oscuridad, para un total de 80 tratamientos. La inducción de callo se observó a los 4 días (d) después de iniciado el cultivo (DDIC) en condiciones de luz y a los 5 d en condiciones de oscuridad, independientemente del tratamiento, excepto en donde no se adicionaron reguladores del crecimiento vegetal (RCV) y en los suplementados sólo con BA. La formación de ES se observó a los 100 DDIC; este proceso se vio favorecido en callos embriogénicos previamente inducidos en el medio MS-25 adicionado con 60 g L⁻¹ de sacarosa, 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg L⁻¹ de BA, en condiciones de oscuridad. Se logró la germinación de todos los ES en el medio MS-50, 60 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar, sin RCV, y se logró regenerar plantas completas de *A. angustifolia* a los 140 DDIC.

Palabras clave: *Agave angustifolia*, embriones somáticos, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 6-benciladenina.

SUMMARY

By using zygotic embryonic axis from seeds of agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw) as explants, it was possible to induce embryogenic calli *in vitro*, and from these calli we obtained somatic embryos (SE). Two concentrations of the Murashige and Skoog (MS) medium were used, 25 and 100 % concentrations (MS-25 and MS-100) combined with 0.0, 1.0, 2.0 and 3.0 mg L⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), with 0.0 and 1.0 mg L⁻¹ of 6-benzyladenine (BA), and 30 and 60 g L⁻¹ sucrose. Cultures were incubated either under 16 h light (38 μmol m⁻² s⁻¹) and 8 h dark, or kept in complete darkness, for a total of 80 treatments. Callus formation was detected 4 days (d) after beginning the culture (DABC) under light conditions and 5 d in dark conditions, independently of the treatment, except where plant growth regulators (PGR) were not added and in those supplemented only with BA. SE formation

was observed at 100 DDIC; this process was favored in embryogenic calli induced with MS-25, 60 g L⁻¹ of sucrose, 3.0 mg L⁻¹ of 2,4-D and 1.0 mg L⁻¹ of BA, and complete darkness. All SE germinated on the MS-50 medium supplemented with 60 g L⁻¹ sucrose and 8 g L⁻¹ agar, without PGR. With this protocol it is possible to regenerate complete plants of *A. angustifolia* in 140 DABC.

Index words: *Agave angustifolia*, somatic embryos, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 6-benzyladenine.

INTRODUCCIÓN

La familia Agavaceae posee un amplio número de especies de importancia económica por que constituyen una fuente renovable de alimento, azúcares, almíbar, fibras, celulosa, saponinas, ensilado para ganado, productos farmacéuticos, bebidas, plantas ornamentales y otros productos más (Madrigal-Lugo *et al.*, 1989). Dentro de esta familia se encuentra el agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw), utilizado en varios estados de la República Mexicana para la elaboración de licores como mezcal o bacanora, actividad que ha provocado su sobreexplotación y, en consecuencia, disminución de las poblaciones silvestres de esta especie (Barraza *et al.*, 2006). *A. angustifolia* se ha propagado convencionalmente en forma asexual por separación de hijuelos, los cuales se desarrollan de rizomas producidos por cultivos establecidos en campo por varios años. Otra forma eficiente de propagación asexual es mediante la micropropagación o cultivo *in vitro*. Con esta técnica recientemente se reportó el enraizamiento de brotes obtenidos *in vitro* a partir de segmentos de médula de tallo de *A. angustifolia* (Enríquez *et al.*, 2005). El mejoramiento genético de esta especie por técnicas convencionales es complicado por el largo tiempo requerido (10 a 20 años) para producir semillas, periodo característico de los agaves; además los pentaploides (2n = 5x = 60) presentan

infertilidad (Robert *et al.*, 1987).

La embriogénesis somática es considerada una poderosa herramienta para la regeneración y mejoramiento genético de plantas, que puede ser inducida en forma directa sobre el explante o indirectamente a partir de callo. Este proceso morfogénico se favorece mediante la transferencia de los explantes de un medio de cultivo suplementado con altas concentraciones de auxinas, a uno libre de este tipo de reguladores del crecimiento (Halperin y Wetherell, 1964).

En el género *Agave* la mayoría de los protocolos reportados se han orientado a la multiplicación masiva *in vitro* vía organogénesis (Rodríguez-Garay *et al.*, 1996). Hay estudios que muestran que cada especie de *Agave* requiere concentraciones y combinaciones particulares de reguladores del crecimiento vegetal para lograr una eficiente regeneración de vitroplantas (Martínez-Palacios *et al.*, 2003; Nikam *et al.*, 2003; Domínguez *et al.*, 2008; Ramírez-Malagón *et al.*, 2008). Asimismo, la respuesta depende del tipo de explante; por ejemplo, Powers y Backhaus (1989) reportaron la propagación *in vitro* de *A. arizonica* Gentry & Weber a partir de secciones de hoja. Por su parte, Groenewald *et al.* (1977) lograron la producción de estructuras parecidas a embriones somáticos al usar fragmentos de semillas como explantes en una especie de *Agave*, pero la embriogénesis somática no fue confirmada. Rodríguez-Garay *et al.* (1996) y Martínez-Palacios *et al.* (2003) reportaron embriogénesis somática en *A. victoria-reginae* Moore, a partir de explantes de hoja y segmentos de tallo. Santacruz-Ruvalcaba *et al.* (1999) lograron la propagación *in vitro* de *A. parrasana* Berger a través de brotes axilares, y Nikam *et al.* (2003) lograron inducir embriones somáticos y la regeneración de *A. sisalana* a partir de bulbillos de inflorescencias. Sin embargo, en *A. angustifolia* Haw no hay reportes que indiquen su regeneración *in vitro* a través de embriogénesis somática al utilizar ejes embrionarios cigóticos como explantes.

Los objetivos en este trabajo de investigación fueron: 1) Evaluar el efecto de dos concentraciones de las sales inorgánicas del medio MS, dos niveles de sacarosa, cinco niveles de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, dos niveles de 6-benciladenina, y dos condiciones de iluminación (luz y oscuridad), en la inducción de callo embriogénico en *A. angustifolia* Haw; y 2) Promover la formación de embriones somáticos en callos embriogénicos mediante la reducción de la concentración original del medio MS, y del nivel del ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inducción de callo embriogénico

Como material vegetativo se usaron semillas colectadas de plantas silvestres fenotípicamente promisorias de agave mezcalero (*Agave angustifolia* Haw) localizadas en Zumpahuacán, Estado de México. Las semillas se desinfectaron superficialmente en forma secuencial, a chorro de agua corriente y jabón antibacterial Dial® por 15 min; después se sumergieron por 1 min en etanol 96 %, 15 min en hipoclorito de sodio (NaClO) 1 %, y finalmente dentro de una campana de flujo laminar se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada.

Después de desinfectar las semillas, se extrajeron los ejes embrionarios cigóticos (EC) (Figura 1A) y se colocaron cinco por frasco de vidrio de 145 mL con 25 mL de medio de cultivo. Cada EC se consideró como una repetición, y se usaron 10 EC por tratamiento. El medio de cultivo se formuló con las sales inorgánicas del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con las vitaminas L2 descritas por Phillips y Collins (1979). En todas las etapas, el pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.1 y se solidificó con 8 g L^{-1} de agar (Sigma®). Posteriormente se esterilizaron los frascos con el medio de cultivo en una autoclave vertical (AESA®) por 20 min, a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y 1.1 kg cm^{-2} de presión.

Para inducir el callo embriogénico, se probó el efecto del medio MS a dos concentraciones, 25 y 100 % (MS-25 y MS-100) combinadas con 30 ó 60 g L^{-1} de sacarosa, con 0.0, 0.5, 1.0, 2.0 ó 3.0 mg L^{-1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 0.0 ó 1.0 mg L^{-1} de 6-benciladenina (BA), y con dos condiciones de iluminación: 16 h luz y 8 h de oscuridad, con luz provista por lámparas de luz blanca fluorescentes ($38 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), y oscuridad completa. Se evaluó un total de 80 tratamientos con 10 repeticiones cada uno; como testigos se consideraron los tratamientos sin reguladores del crecimiento vegetal (RCV). Los explantes fueron incubados a $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Formación de embriones somáticos (ES)

Para inducir la formación de ES, todos los callos embriogénicos previamente obtenidos en los tratamientos evaluados fueron transferidos al medio MS a 50 % de su concentración original (MS-50), suplementado con 0.1 mg L^{-1} de 2,4-D y 30 g L^{-1} de sacarosa, en condiciones de luz u oscuridad, según el tratamiento en el que se había inducido el callo embriogénico.

A los 70 d de incubación se contó el número de callos embriogénicos y de ES formados en cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un arreglo factorial y una prueba de F ($P \leq 0.05$) con el paquete estadístico Minitab Inc. (Hair *et al.*, 1998).

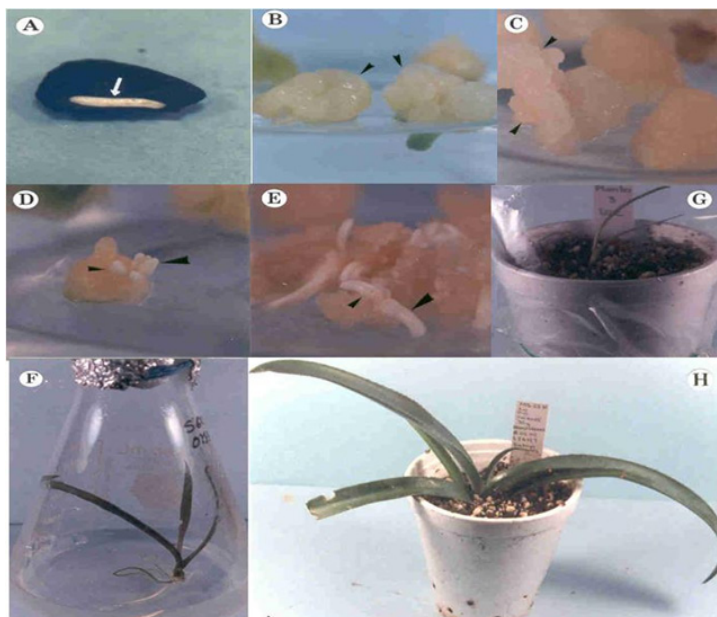


Figura 1. Regeneración de plantas de *Agave angustifolia* Haw, vía embriogénesis somática y su adaptación a suelo. A) Eje embrionario cigótico (flecha blanca) extraído de la semilla. B) Callos compactos de color blanco-amarillento-perlado a 40 días después de iniciado el cultivo (DDIC). C) Aspecto de los callos embriogénicos de consistencia friable (flechas). D) Embriones somáticos en fase de torpedo (cabezas de flecha) formados en condiciones de luz en el tratamiento MS-100, 60 g L⁻¹ de sacarosa, 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0.0 mg L⁻¹ de BA a los 80 DDIC. E) Embriones somáticos en fase cotiledonar (cabezas de flecha) en condiciones de oscuridad a los 100 DDIC, proveniente de un callo inducido en el tratamiento MS-25, 60 g L⁻¹ de sacarosa, 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg L⁻¹ de BA. F) Aspecto de una planta de *A. angustifolia* regenerada a partir de un ES, 40 d después de transferido al medio de cultivo para su germinación y a 140 DDIC. G) Vitroplanta en etapa de adaptación a los 180 DDIC. H) Vitroplanta adaptada a condiciones medio ambientales a los 202 DDIC.

Germinación de embriones somáticos (ES) y adaptación de plantas regeneradas *in vitro*

Para la germinación de los ES se utilizó el medio MS-50 sin RCV, suplementado con 15 g L⁻¹ de sacarosa y solidificado con 8 g L⁻¹ de agar.

Las plantas de *A. angustifolia* regeneradas *in vitro*, vía ES, fueron lavadas con agua común para eliminar los residuos del medio de cultivo y se colocaron en vasos de unicel de 300 mL llenados con una mezcla de agrolita y composta (relación de 3:1) como sustrato. Los vasos fueron cubiertos con bolsas blancas de polietileno por un periodo de 21 d, a las que gradualmente se les hicieron perforaciones a fin de incrementar el intercambio gaseoso y robustecer a las plantas, antes de transferirlas a condiciones de invernadero rústico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de callo embriogénico

En el género *Agave* las respuestas morfológicas *in vitro* son variadas y dependen del genotipo, del tipo y concentración de los RCV utilizados (Ramírez-Malagón *et al.*, 2008). Así, Groenewald *et al.* (1977) lograron aumentar la tasa

de inducción de callo en especies de *Agave* al incrementar el nivel de 2,4-D en presencia de cinetina, mientras que en *A. fourcroydes* (Robert *et al.*, 1987), *A. victoriae-reginae* (Martínez-Palacios *et al.*, 2003) y en otras plantas monocotiledoneas (Li *et al.*, 2006), las bajas concentraciones de citocininas en el medio de cultivo, particularmente BA, favorecieron la inducción y crecimiento de callo.

En el presente trabajo se observó la inducción de callo a partir de EC (Cuadro 1) con cualquiera de las concentraciones de 2,4-D evaluadas. Este proceso morfológico inició con el aumento de tamaño de los explantes (EC) en forma de bellota, a los 4 días (d) después de iniciado el cultivo (DDIC) en condiciones de luz y a los 5 d en condiciones de oscuridad. Se detectó la formación de dos tipos de callos: unos de color blanco-amarillo perlado y de consistencia dura (Figura 1B), y otros de color blanco-cremoso, de consistencia suave y friable (Figura 1C). La coloración blanco-amarillo perlado predominó en los explantes cultivados bajo condiciones de luz, mientras que el blanco-cremoso en los cultivados en oscuridad. La consistencia de los callos de color blanco-cremoso facilitó su manejo para realizar subcultivos, y así continuar su crecimiento.

El mayor crecimiento de callo se registró en los tratamientos suplementados con 2.0 y 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D,

sobre todo cuando contenían 1.0 mg L⁻¹ de BA; los callos obtenidos a los 60 DDIC en los tratamientos formulados con MS-25, bajo las concentraciones y combinaciones óptimas antes señaladas, pasaron de 1.2 g a 2.5 g a los 140 DDIC. En contraste, en el tratamiento en donde sólo se adicionó BA no se logró la inducción de callo; únicamente se desarrolló la parte apical de la planta pero sin crecimiento de raíz, probablemente debido a que las citocininas favorecen principalmente la formación de brotes (Vidalie, 1986).

Cuadro 1. Efecto de dos concentraciones de las sales del medio MS, dos niveles de sacarosa, luz y oscuridad y de dos reguladores del crecimiento vegetal, en la inducción de callo embriogénico y formación de embriones somáticos (ES) en *Agave angustifolia* Haw.

Factor de estudio	Callogénesis (%)	Número de embriones somáticos (ES) formados (%)	
MS ⁺	100	40 (15.0)	
	25	228 (85.0)	
Sac (g L ⁻¹)	30	72 (26.9)	
	60	196 (73.1)	
2,4-D (mg L ⁻¹)	BA (mg L ⁻¹)	0	0 (0.0)
		0.0	2 (0.7)
		0.5	2 (0.7)
		1.0	20 (7.5)
		2.0	28 (10.4)
		3.0	0 (0.0)
		0.0	2 (0.7)
		1.0	30 (11.2)
		2.0	2 (0.7)
		3.0	182 (67.9)
CC ⁺⁺	Luz	52 (19.4)	
	Oscuridad	216 (80.6)	

⁺ MS = Murashige y Skoog, (1962). ⁺⁺ CC = condiciones de iluminación.

En los tratamientos sin RCV los EC germinaron en 2 ó 3 DDIC, tanto en luz como en oscuridad. Estos explantes posteriormente formaron plántulas de 4 a 6 cm de altura con dos o tres hojas, a los 45 DDIC. En los tratamientos testigo no se observó formación de callo, aún después de 120 DDIC. En contraste, la inducción de callo embriogénico sólo fue posible en los tratamientos suplementados con 2,4-D, con o sin BA, independientemente de la concentración de las sales del medio (MS-25 o MS-100), del nivel de sacarosa o de si crecieron en luz u oscuridad, condiciones en las que la inducción de callo varió fue de 10 a 40 % (Cuadro 1). El análisis estadístico de los cinco factores con respecto a la inducción de callo embriogénico, mostró que todos los factores principales fueron estadísticamente significativos (Cuadro 2). El 2,4-D es un regulador sintético

del crecimiento que puede actuar como inductor efectivo de callo embriogénico (Pierik, 1990), probablemente porque ejerce un fuerte estrés sobre las células del explante y en respuesta éstas adquieren capacidad embriogénica en diferentes grados, como fue reportado recientemente por Kikuchi *et al.* (2006). Así mismo, la interacción de los factores evaluados fueron significativas, con excepción de la interacción de los factores B x C x D (Cuadro 2).

Formación de embriones somáticos (ES)

En los tratamientos suplementados con 2,4-D, la capacidad embriogénica de los callos inducidos en el medio MS-25 fue casi seis veces mayor (85 %) que la obtenida con el medio MS-100 (15 %) (Cuadro 1). Al parecer, es necesario un equilibrio de los iones amonio y nitrato en el medio de cultivo, principalmente con una baja concentración de las dos formas, para favorecer la inducción de callo (Arzate-Fernández *et al.*, 1997); posteriormente este equilibrio acentúa la formación de ES.

Se ha reportado que la adición de carbohidratos estimula la histodiferenciación (Ramsay *et al.*, 2003). Según Körbes y Droste (2005), la concentración de sacarosa puede afectar la inducción morfogénica, como fuente nutritiva y como regulador del potencial osmótico del medio de cultivo. En

Cuadro 2. Análisis de varianza de la capacidad embriogénica de callos inducidos a partir de ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw, en respuesta a cinco factores evaluados y sus interacciones.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P (0.05)
RC (A)	9	46.685	5.187	70.55	0.0000*
MS (B)	1	4.112	4.112	55.92	0.0000*
Sac (C)	1	1.195	1.195	16.25	0.0001*
CC (D)	1	2.229	2.229	30.32	0.0000*
Interacciones					
A x B					0.0000*
A x C					0.0000*
A x D					0.0000*
B x C					0.0046*
B x D					0.0000*
C x D					0.0025*
A x B x C					0.0000*
A x B x D					0.0000*
A x C x D					0.0000*
B x C x D					0.9603ns
A x B x C x D					0.0000*

ns = no significativo.

el presente estudio, la formación de ES se incrementó en 2.7 veces (196 vs. 72) en los callos embriogénicos obtenidos en el medio con 60 g L⁻¹ de sacarosa, con respecto al medio con 30 g L⁻¹ (Cuadro 1).

En los tratamientos donde se usó 2,4-D combinado con 1.0 mg L⁻¹ de BA, la capacidad embriogénica expresada fue mayor que en ausencia de BA porque se formó un total de 216 ES (80.6 %), mientras que en los tratamientos que contenían 2,4-D sin BA sólo se formaron 52 ES (19.4 % del total de los ES obtenidos). El mayor número de ES formados (182) fue obtenido en el tratamiento con 3 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L⁻¹ de BA, como se muestra en el Cuadro 1.

Según Groenewald *et al.* (1977), al reducir en cinco veces la concentración del 2,4-D se logra inducir morfogénesis en callos de *Agave* cultivados *in vitro*. En cambio, una exposición prolongada de los explantes al 2,4-D afecta el desarrollo de la zona meristemática de los ES, cuya diferenciación celular inicia desde su estadio globular. Además, en este estadio el transporte polar de la auxina es esencial para establecer la polaridad del ES, la cual puede ser afectada si existe un incremento o exposición prolongada de auxina (Arzate-Fernández *et al.*, 2008). En esta investigación, los callos embriogénicos inducidos fueron sometidos a una concentración de 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D, que es una concentración reducida de este regulador del crecimiento vegetal, lo cual pudo haber favorecido la formación de ES independientemente de la presencia de BA.

Arzate-Fernández *et al.* (1997 y 2008) reportaron que el uso de una fase oscura es un paso importante para la inducción de callo en *Lilium longiflorum* y *Strelitzia reginae*. También Morini *et al.* (2000) señalaron que las condiciones de oscuridad favorecen la inducción de callo embriogénico en membrillo (*Cydonia oblonga* M.), para posteriormente inducir la formación de ES bien formados. En el presente trabajo, los EC respondieron de manera muy similar a las condiciones de luz u oscuridad; sin embargo, los EC incubados en oscuridad alcanzaron mayor eficiencia en la inducción de callo y en la formación de ES. Es posible que el efecto del 2,4-D mejore el estímulo morfogénico de explantes cultivados en oscuridad, debido a que la degradación de esta auxina es más lenta en esas condiciones (Arzate-Fernández *et al.*, 1997).

Germinación de embriones somáticos (ES) y adaptación de plantas regeneradas *in vitro*

Los ES en fase cotiledonar (Figura 1, D y E) obtenidos fueron transferidos al medio de germinación descrito previamente, donde se logró 100 % de germinación. La germinación inició con el desarrollo de la parte apical y

posteriormente del sistema radicular; estas vitroplantas alcanzaron una altura de 4 a 7 cm a los 40 d (Figura 1F). Todas las plántulas regeneradas *in vitro* vía ES, lograron adaptarse (Figura 1, G y H) a las condiciones de invernadero rústico, después de 40 d de la transferencia al medio de germinación.

CONCLUSIONES

Fue posible la formación de embriones somáticos, previa inducción de callos embriogénicos, al utilizar como explantes a ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. Los factores aquí evaluados fueron importantes en la inducción de callos embriogénicos y en la formación de embriones somáticos de esta especie. Las altas concentraciones de 2,4-D (2.0 a 3.0 mg L⁻¹) favorecen la inducción de callos embriogénicos con una alta capacidad de formación de embriones somáticos. La posterior reducción de la concentración de 2,4-D a 0.1 mg L⁻¹ favorece la formación de embriones somáticos.

El mejor tratamiento para la inducción de callo embriogénico y de embriones somáticos fue: MS a 25 % de su concentración original, suplementado con 60 g L⁻¹ de sacarosa, 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg L⁻¹ de BA, en condiciones de completa oscuridad.

Todas las plantas regeneradas (216) a través de embriones somáticos se adaptaron a condiciones ambientales del invernadero rústico.

AGRADECIMIENTOS

A la Coordinación General de Investigación de la Universidad Autónoma del Estado de México, por el financiamiento parcial otorgado a través del programa "Enlace de Investigación".

BIBLIOGRAFÍA

- Arzate-Fernández A-M, J L Piña-Escutia, H A Zavaleta-M (2008) Inducción de proembriones somáticos en ave de paraíso (*Strelitzia reginae* Banks). Rev. Fitotec. Mex. 31:183-186.
- Arzate-Fernández A-M, T Nakazaki, Y Okumoto, T Tanisaka (1997) Efficient callus induction and plant regeneration from filaments with anther in Lily (*Lilium longiflorum* Thunb.). Plant Cell Rep. 16:836-840.
- Barraza A, F L Sánchez, M Robert, M Esqueda, A Gardea (2006) Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw de la Sierra Sonorense, México, determinada con marcadores RFLP. Rev. Fitotec. Mex. 29:1-8.
- Domínguez M S, A G Alpuche, N L Vasco, E P Molphe (2008) Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de agaves mexicanos. Rev. Fitotec. Mex. 31:317-322.
- Enríquez V J R, G Carrillo, J L Rodríguez (2005) Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. Rev. Fitotec. Mex. 28:175-178.
- Groenewald E G, D C J Wessels, A Koeleman (1977) Callus formation

- and subsequent plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (Agavaceae). Z. Pflanzenphysiologie Bd. 815:369-373.
- Hair J F, R E Anderson, R L Tatham, W C Black (1998)** Multivariate Data Analysis. 5th ed. Prentice Hall. USA. pp:239-322.
- Halperin W, D F Wetherell (1964)** Adventitious embryony in tissue cultures of will carrot (*Daucus carota*) Amer. J. Bot. 51:274-283.
- Kikuchi A, N Sanuki, K Higashi, T Koshib, H Kamada (2006)** Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. Planta 223:637-645.
- Körbes A P, A Droste (2005)** Carbon sources and polyethylene glycol on soybean somatic embryo conversion. Pesq. Agropec. Bras. 40:211-216.
- Li R, A H Bruneau, R Qu (2006)** Improved plant regeneration and *in vitro* somatic embryogenesis of St Augustinegrass [*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze]. Plant Breed. 125:52-56.
- Madrigal-Lugo R, F Pineda-Estrada, J L de la O Rodríguez (1989)** Agave. In: Handbook of Plant Cell Cult. Ornamental Species. PV Ammirato, DA Evans, WR Sharp, YPS Bajaj (eds). McGraw Hill Publ. Co. New York. pp:206-227.
- Martínez-Palacios A, M P Ortega-Larrocea, V M Chávez, R Bye (2003)** Somatic embryogenesis and organogenesis of *A. victoria-reginae*: Considerations for its conservation. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 74:135-142.
- Morini S, C D'Onofrio, G Bellocchi, M Fisicella (2000)** Effect of 2,4-D and light quality on callus production and differentiation from *in vitro* cultured quince leaves. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 63:47-55.
- Murashige T, F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Nikam T D, G M Bansude, K C Aneesh Kumar (2003)** Somatic embryogenesis in sisal (*A. sisalana* Perr. ex. Engelm). Plant Cell Rep. 22:188-194.
- Phillips G C, G B Collins (1979)** *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. Crop Sci. 19:59-64.
- Pierik R L M (1990)** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp:209-226.
- Powers D E, R A Backhaus (1989)** *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 16:57-60.
- Ramírez-Malagón R, A Borodanenko, L Pérez-Moreno, M D Salas-Araiza, H G Nulez-Planius, N Ochoa-Alejo (2008)** *In vitro* propagation of three *Agave* species used for liquor distillation and three for landscape. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 94:201-207.
- Ramsay J L, D Galitz, C W Lee (2003)** Basal medium and sucrose concentration influence regeneration of Easter Lily in ovary culture. HortScience 38:404-406.
- Robert M L, J L Herrera, F Contreras, N K Score (1987)** *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem (Henequén). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 8:37-48.
- Rodríguez-Garay B, Gutiérrez-Mora A, B Acosta-Dueñas (1996)** Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46:85-87.
- Santacruz-Ruvalcaba F, H Gutiérrez, B Rodríguez (1999)** Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 56:163-167.
- Vidalie H (1986)** Cultivo *in vitro*. Ed. Científica, S.A de C.V. México, D.F. pp:1-138.