

El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*

MC. Manuel Salvador Domínguez Rosales¹, Biól. Ma. de la Luz González Jiménez², Citlalli Rosales Gómez³, César Quiñones Valles³, Silvestre Delgadillo Díaz de León³, Silvia Julieta Mireles Ordaz³, Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch⁴

RESUMEN

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. 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 este trabajo se presentan los antecedentes que existen sobre este tema en la literatura científica internacional, así como algunos de los avances alcanzados en la Universidad Autónoma de Aguascalientes con el desarrollo de sistemas que permiten la propagación masiva *in vitro* de varias especies de *Agave*.

ABSTRACT

Agaves are one of the most representative plant groups in México. Its importance goes from ecolo-

Palabras clave: Citocininas, cultivo *in vitro*, especies amenazadas, micropropagación.

Key words: Cytokinins, *In vitro* culture, micropropagation, threatened species.

Recibido: 11 de febrero de 2008, aceptado: 7 de mayo de 2008

- ¹ Alumno del Doctorado en Ciencias Biológicas. Centro de Ciencias Básicas
- ² Alumna de la Maestría en Ciencias en Biotecnología Vegetal
- ³ Alumnos de la Licenciatura en Biología
- ⁴ Profesor-Investigador del Dpto. de Química. Centro de Ciencias Básicas, correo electrónico: eperezmb@correo.uaa.mx, teléfono: 910-84-03, Fax 910-84-01.

gical and economic value, to its cultural aspect. Unfortunately, many species of this group have been neglected from the points of view of improvement, rational exploitation and conservation. In this sense, Plant Biotechnology can contribute with valuable tools that allow the rational use of these plants and at the same time helps to its conservation. In this work, antecedents that exist in this topic in the international scientific literature are presented, as well as some of the advances reached at the Universidad Autónoma de Aguascalientes with the development of systems that allow the massive *in vitro* propagation of several *Agave* species.

INTRODUCCIÓN

El género *Agave*, que se ubica en la familia Agavaceae, incluye varias especies de plantas adaptadas a condiciones de aridez. Tienen una forma característica de roseta y poseen raíces muy ramificadas, cutícula gruesa, hojas suculentas con estomas hundidos y metabolismo fotosintético tipo CAM. Se reportan 197 especies incluidas dentro de los dos subgéneros reconocidos (*Littaea* y *Agaveae*). De este total de especies, 136 las podemos encontrar en México. Por lo anterior, nuestro país es considerado como centro de origen del género. Numerosas especies del género *Agave* han sido utilizadas como alimento por los pobladores de Mesoamérica desde hace por lo menos 9,000 años. Son muchos los hallazgos arqueológicos que confirman el papel fundamental que estas plantas jugaron en el desarrollo de los pueblos autóctonos de la parte central de México. Con la llegada de los conquistadores españoles, el cultivo de los agaves fue llevado a otras regiones de Norteamérica, e incluso a otros continentes. Un ejemplo de esto es

la especie *Agave americana*, llevada por los europeos a las islas Azores, Canarias y gran parte de la cuenca del Mediterráneo, en donde se convirtió en una especie ornamental muy importante. En este aspecto destacan también las especies productoras de fibra como *A. cantala* y *A. sisalana*, que fueron la base de industrias coloniales de gran importancia en Indonesia, Filipinas y África del Este.

La estrecha relación establecida entre los mexicanos y el *Agave* permanece hasta hoy. Estas plantas satisfacen varias de las necesidades de los pobladores de las zonas áridas y semiáridas del país, e incluso llegan a ser el soporte de importantes actividades económicas generadoras de riqueza como lo son la industria tequilera, mezcalera y de fibras naturales. Actualmente, los tallos (piñas), quiotes (inflorescencias inmaduras), bases de las hojas y flores son aún parte de la dieta en muchas regiones del país, mientras que las hojas se usan como forraje para el ganado. El aguamiel, obtenido de la piña y de la base del quiote de varias especies de *Agave*, ha sido un complemento muy importante en la dieta de los pobladores de las zonas áridas. Asimismo es la base de una industria, ya que puede fermentarse para obtener pulque, concentrarse para obtener miel de maguey, así como ser procesada para obtener fructosa.

Como puede verse, los agaves son plantas de crucial importancia para nuestro país. A pesar de lo anterior, se han hecho relativamente pocos esfuerzos por estudiarlos, mejorarlos y conservarlos. La mayoría de los trabajos en este sentido se han realizado con aquellas especies ya consideradas como cultivadas, como las usadas para la producción de tequila, mezcal, aguamiel, pulque, fibras, etc. Otras especies, que no son cultivadas, y que tienen hábitats más restringidos, han sido descuidadas al grado de que muchas de ellas se encuentran en riesgo de extinción. La NOM-059-ECOL-2001 reconoce la existencia de 18 especies dentro del género cuya supervivencia se ve severamente amenazada en estos momentos. Esta situación se debe, principalmente, a la sobreexplotación de poblaciones silvestres, el saqueo ilegal de plantas jóvenes para ser usadas como ornamentales y la destrucción de su hábitat.

Por otro lado, el crecimiento muy lento de estas plantas, así como sus bajas tasas de reproducción asexual y reproducción sexual limitada por problemas de polinización y viabilidad de las

semillas, son factores que hacen a los agaves difíciles de multiplicar masivamente por métodos convencionales. Estos mismos factores limitan las posibilidades de mejoramiento de las especies cultivadas. Una alternativa prometedora para la resolución de estos problemas es la aplicación en estas especies de las técnicas de propagación y mejoramiento derivadas de la Biotecnología Vegetal. En estos momentos, la técnica más usada en este campo es la llamada micro propagación o *in vitro*, misma que consiste en la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

Las ventajas que ofrece la micropropagación con respecto a los métodos convencionales:

- a) Se trata de un sistema de propagación clonal, es decir, que mantiene todas las características genotípicas del material inicial seleccionado.
- b) Debido a que se realiza todo el proceso en un laboratorio bajo ambientes controlados se trata de un sistema totalmente independiente de las condiciones externas, por lo que no se ve afectado por las estaciones del año, sequías, heladas, altas temperaturas u otros factores ambientales.
- c) El número de plantas que se puede obtener mediante micropropagación es por su naturaleza prácticamente ilimitado.
- d) El espacio que se requiere es mínimo, y el tiempo en que puede realizarse el proceso es relativamente corto.
- e) Las plantas que se obtienen están libres de bacterias, hongos y nemátodos fitopatógenos, y con técnicas más específicas se pueden liberar incluso de virus y viroides. En el caso particular de los agaves, la propagación asexual por hijuelos tiene la desventaja de que éstos llevan de inicio los patógenos que pudieran estar afectando a la planta madre.

Además de la micropropagación, la Biotecnología aporta otras técnicas que pueden resultar importantes para el estudio, mejoramiento y conservación de los *Agaves*. Entre éstas, destacan los marcadores moleculares o de ADN y la transformación genética. Los primeros son diferencias entre las secuencias homólogas de ADN de dos organismos. Éstas pueden ser el resultado de translocaciones, inversiones, inserciones, deleciones o mutaciones puntuales. Los marcadores moleculares pueden ser visualizados a través del

uso de diversas técnicas como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) y microsatélites. Esta tecnología tiene aplicaciones importantes, por ejemplo, la generación de huellas genéticas en variedades cultivadas, selección de caracteres deseables ligados a ciertos marcadores en programas de mejoramiento, análisis filogenéticos y el estudio de la variabilidad genética presente en poblaciones.

A pesar de todo lo anterior, son pocos los antecedentes que se tienen acerca de la aplicación de la Biotecnología al género *Agave*. Este artículo hace una revisión de los antecedentes que existen a nivel mundial en el tema, y resume algunos de los trabajos realizados en este sentido en la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Antecedentes sobre la aplicación de la Biotecnología en el Género *Agave*

La mayoría de los trabajos en esta área se refieren al cultivo y propagación *in vitro* de algunas especies del género. La regeneración *in vitro* se ha alcanzado a través de la obtención de brotes a partir de meristemos auxiliares localizados en el segmento basal de las plantas, o bien a través de organogénesis o embriogénesis somática indirecta, es decir, a partir de tejido caloso generado también *in vitro*. En el Cuadro 1 se resumen los trabajos más destacados en el área. En general, todos los antecedentes confirman que la Biotecnología puede ser el método más eficiente para la propagación de plantas de agave con fines de producción masiva o establecimiento de plantaciones.

Especie de <i>Agave</i>	Avance reportado	Medio de cultivo / Reguladores del crecimiento utilizados	Referencia
<i>Agave sp.</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	Linsmaier y Skoog con 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 5 1mg L ⁻¹ de cinetina para la generación de tejido caloso. Mismo medio con 0.2 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 1 mg L ⁻¹ de cinetina para la generación de brotes a partir del callo.	Groenewald y col. (1977)
<i>A. fourcroydes</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	SH adicionado con BA en un rango de 2.2 a 22.2 µM	Robert y col. (1987)
<i>A. arizonica</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	MS con 1.4 µM de 2,4-D para la generación de tejido caloso. Diferenciación de brotes en medio con 44.4 µM de BA y 0.5 o 5.4 µM de ANA.	Powers y Backhaus (1989)
<i>A. cantala</i> <i>A. fourcroydes</i> <i>A. sisalana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	MS con 0.1 mg L ⁻¹ de 2,4-D y 0.1 mg L ⁻¹ de BA para la generación de tejido caloso y brotación.	Binh y col. (1990)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales (rizomas).	MS o SH con BA (22.2 µM).	Das (1992)
<i>A. victoria-reginae</i>	Embriogénesis somática directa en explantes de hoja.	MS con vitaminas L2 y 2,4-D (1,4 µM) para la generación de embriones, MS o SH al 50% para su germinación.	Rodríguez-Garay y col. (1996)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales y organogénesis indirecta.	MS, SH, Gamborg y de White adicionados con diversas concentraciones de BA, de cinetina, de NAA, de IAA y de 2,4-D en combinación o solos.	Nikam (1997)
<i>A. amaniensis</i>	Cultivo de tejido caloso y producción de sapogeninas.	MS con Cinetina (23.2 µM) y 2,4-D (2.26 µM).	Andrijany y col. (1999)

Especie de Agave	Avance Reportado	Medio de Cultivo / Reguladores del crecimiento utilizados	Referencia
<i>A. parrasana</i>	Regeneración de brotes a partir de meristemos basales y organogénesis indirecta.	MS adicionado con BA (13.3, 26.6, 39.9 y 53.2 μM) y 2,4-D (0 y 0.04 μM).	Santacruz-Ruvalcaba y col. (1999)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta.	MS, MS + $(\text{NH}_4\text{NO}_3: 1500 \text{ mg L}^{-1})$ y MS + hidrolizado de caseína (1000 mg L^{-1}), todos adicionados con 2,4-D (9.05 μM) y cinetina (4.6 μM).	Hazra y col. (2002)
<i>A. victoria-reginae</i>	Regeneración por embriogénesis somática y generación de brotes a partir de meristemos basales.	MS con fue con 2.26 μM de 2,4-D para la inducción de callo. MS con 2.2-4.4 μM de BA para la generación de brotes.	Martínez-Palacios y col. (2003)
<i>A. sisalana</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	MS con 2,4-D (0.5-1 mg L^{-1}) más BAP o cinetina (1-2 mg L^{-1}) para la formación de callo. MS con 1 mg L^{-1} de cinetina para la diferenciación de embriones somáticos.	Nikam y col. (2003)
<i>A. angustifolia</i>	Generación de brotes de a través de organogénesis directa a partir de segmentos de médula de tallo.	MS con 1 mg L^{-1} de BA.	Enríquez del Valle y col. (2005)
<i>A. tequilana</i>	Regeneración de plantas a través de organogénesis indirecta y generación de brotes a partir de meristemos.	Para la formación de callo el mejor tratamiento fue con ANA. La regeneración a partir de meristemos y de callo se logró con 1.1 μM de 2,4-D y 44 μM de BA.	Valenzuela-Sánchez y col. (2006)
<i>A. salmiana</i>	Generación de brotes a partir de meristemos.	MS con 2.0 mg l^{-1} BA y 0.25 mg l^{-1} AIA.	Silos-Espino y col. (2007)
<i>A. tequilana</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	Se utilizaron MS más combinaciones de 2,4-D/BA μM para la formación de callo. MS más distintas concentraciones de BA, cinetina, 2iP y TDZ para la diferenciación de embriones somáticos	Portillo y col. (2007)
<i>A. vera-cruz</i>	Regeneración por embriogénesis somática.	Se utilizó MS adicionado con 4.52 μM de 2,4-D para la formación de callo. MS adicionado con 5.37 μM de NAA más 0.91 μM de zeatina.	Tejavathi y col. (2007)

Cuadro 1. Antecedentes sobre el cultivo y propagación *in vitro* de especies del género *Agave*.

Otra aplicación de la Biotecnología reportada para este género es el uso de los marcadores moleculares para el conocimiento de la diversidad genética y la caracterización de variedades. En este sentido, Gil-Vega y col. (2001) reportaron los resultados de un análisis de la diversidad genética del *Agave tequiliana* var. azul usando marcadores RAPD. Para esto, se colectaron 10 plantas de cuatro diferentes campos cultivados con esta especie. Dos campos se localizaban en cada una de las dos regiones más importantes en

México para la producción de esta especie (separadas por 100 km). Sólo el 0.8% de los marcadores resultaron polimórficos y 39 de las 40 plantas incluidas en el estudio fueron completamente isogénicas. Este es uno de los niveles más bajos de polimorfismo reportados para una planta cultivada y es consecuencia de la propagación exclusivamente vegetativa por varias generaciones de un solo material inicial. También se analizaron las relaciones genéticas entre la variedad "azul" y las variedades "chato" y "siguín". Los resultados

indicaron que la variedad "azul" está más relacionada con la "siguin" y la "chato" es la más alejada de ambas. Por su parte, Keb-Llanes y col. (2002) propusieron un método rápido y eficiente para la extracción de ADN a partir de tejidos del agave. Ese protocolo permitió la extracción simultánea de ADN de hasta 80-100 muestras diarias a un bajo costo y con poco desperdicio de reactivos. El ADN obtenido con este protocolo fue usado con éxito para análisis tipo AFLP. Trabajaron con *Agave deserti*, *A. angustifolia*, *A. americana*, *A. sisalana* y tres variedades de henequén (*A. fourcroydes*).

En lo que respecta al mejoramiento de las plantas, una de las posibilidades más atractivas que ofrece la Biotecnología es la transformación genética. En el caso del género *Agave*, los reportes en este sentido son muy escasos. Flores-Benítez y col. (2007) reportan la transformación genética del *Agave salmiana* a través de dos técnicas diferentes, cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* y bombardeo con micropartículas cargadas con ADN. Se usaron sólo genes reporteros y marcadores y la regeneración de plantas transgénicas se hizo a través de embriogénesis somática. Por su parte, Rodríguez-Hernández y col. (2007) generaron raíces transformadas de esta misma especie (*A. salmiana*) a través del cocultivo con *Agrobacterium rhizogenes*, y demostraron la capacidad de estas raíces para ser colonizadas por el hongo micorrízico *Glomus intraradices*.

Finalmente, otra área en la que se están iniciando los estudios con las plantas del género *Agave*, es la Biotecnología de Alimentos. En este campo, son de especial interés los estudios acerca de los fructanos, carbohidratos no reductores solubles en agua, compuestos de unidades de fructosa, que usualmente contienen una molécula de glucosa terminal. Su estructura puede ser en forma lineal o ramificada y en menor grado cíclica. Son los principales productos fotosintéticos generados por los agaves. Numerosos reportes indican que los fructanos estimulan selectivamente el crecimiento y actividad de *Bifidobacteria* y *Lactobacilli* en el intestino, e inhiben el crecimiento de bacterias patogénicas, definiéndose entonces a este tipo de carbohidratos como prebióticos. Además, su importancia radica también en que son la principal fuente de carbohidratos para la producción de tequila. Debido a esta importancia, se ha dilucidado la estructura molecular de los fructanos producidos por *Agave tequiliana*, encontrándose una mezcla compleja

de fructooligosacáridos conteniendo principalmente enlaces de tipo $\beta(2-1)$ y algunas ramificaciones tipo $\beta(2-6)$, concluyéndose también que los fructanos de esta especie no son de tipo inulina como se suponía anteriormente (López y col. 2003).

Avances en la Biotecnología aplicada al género *Agave* en la Universidad Autónoma de Aguascalientes

En el Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes se han desarrollado proyectos dirigidos al establecimiento de metodologías que permitan el cultivo y propagación *in vitro* de varias especies del género *Agave*. Se han seleccionado especies importantes para la producción de mezcal y pulque, como lo son *A. cupreata*, *A. karwinskii*, *A. palmeri*, *A. potatorum* y *A. salmiana*. También se seleccionaron algunas especies silvestres, amenazadas y con alto valor ornamental, como *A. bracteosa*, *A. chiapensis*, *A. difformis*, *A. nizandensis*, *A. obscura*, *A. ornithobroma*, *A. peacockii*, *A. titanota* y *A. victoria-reginae*. Se ha alcanzado la propagación *in vitro* de todas estas especies a través de la producción de brotes en meristemos basales (Fig. 1). Esto se logra inoculando segmentos basales de plántulas germinadas *in vitro* en medios de cultivo que contengan citocininas como la Benciladenina (BA), 6- γ , γ -Dimetilalilaminopurina (2iP), Cinetina (Cin), Tidiazurón (TDZ) y Metatopolina (MT). La eficiencia de estos sistemas va desde la producción de 2.2 brotes por cada explante en *A. palmeri*, hasta 30 brotes por explante en *A. victoria-reginae*, esto en un ciclo de propagación de 40-60 días. Cada uno de los brotes formados puede enraizarse para generar una nueva planta, o bien, puede ser usado para obtener más explantes para un nuevo ciclo de propagación. Las tasas de proliferación obtenidas en la mayoría de las especies indican que bajo sistemas de propagación masiva podrían obtenerse entre 10 000 y 1 000 000 de brotes partiendo de un solo explante y sometiéndolo a cinco ciclos de proliferación *in vitro* (menos de un año en tiempo). Los valores extremos son *A. palmeri*, que sólo daría 51.5 brotes en estas condiciones, y *A. victoria-reginae*, con el potencial de generar 24 300 000. El enraizamiento de los brotes generados se logra en la mayoría de los casos transfiriéndolos a un medio carente de reguladores del crecimiento. En algunas especies sólo es necesario agregar al medio de cultivo auxinas o bien carbón activado con el fin de estimular la generación de raíces. La adaptación

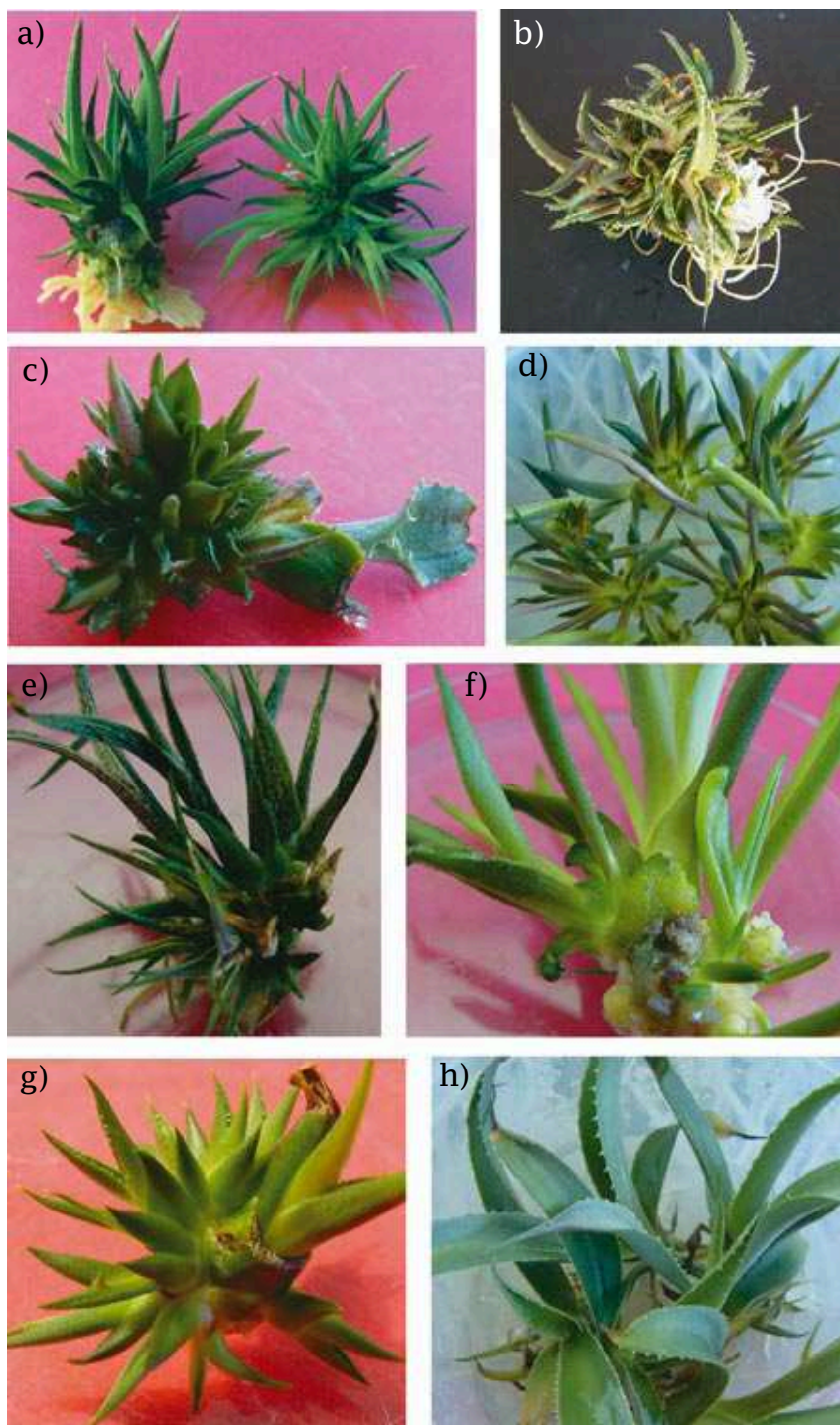


Figura 1. a) Brotes de *Agave victoria-reginae* obtenidos en medio con 1 mg L^{-1} de 2ip; b) Brotes de *A. peacockii* generados en medio con 1.0 mg/L de BA; c) Generación de brotes en un explante basal de *A. salmiana* cultivado en medio con 0.1 mg L^{-1} de TDZ. d) Brotes de *A. cupreta* desarrollados en medio adicionado con 2.0 mg L^{-1} de BA. e) Explante de *A. difformis* con brotes obtenidos en medio con 2.0 mg/L de 2iP. f) Desarrollo de brotes en un explante basal de *A. karwinskii* cultivado en medio con 1.0 mg L^{-1} de BA. g) Brotes de *A. obscura* generados en medio con 1.0 mg L^{-1} de MT. h) Obtención de brotes de explante basal de *A. potatorum* sembrado en medio con 1.5 mg L^{-1} de CIN. (Barra = 10 mm).

al suelo y al ambiente externo de las plántulas generadas *in vitro* ocurre sin problemas, siempre y cuando la transferencia se haga después de un proceso de adaptación paulatina (Fig. 2).

Con los métodos antes descritos, se han generado plantas que muestran una apariencia y desarrollo normales en suelo. Otra vía de regeneración

que se ha probado con algunas de las especies mencionadas, es la organogénesis indirecta (Fig. 3). Ésta consiste en una primera fase en la que se genera tejido calloso al inocular explantes basales, o segmentos de hoja, en medios de cultivo con reguladores del crecimiento en dosis más altas que las requeridas para la propagación a partir de meristemas. Además, se requiere para

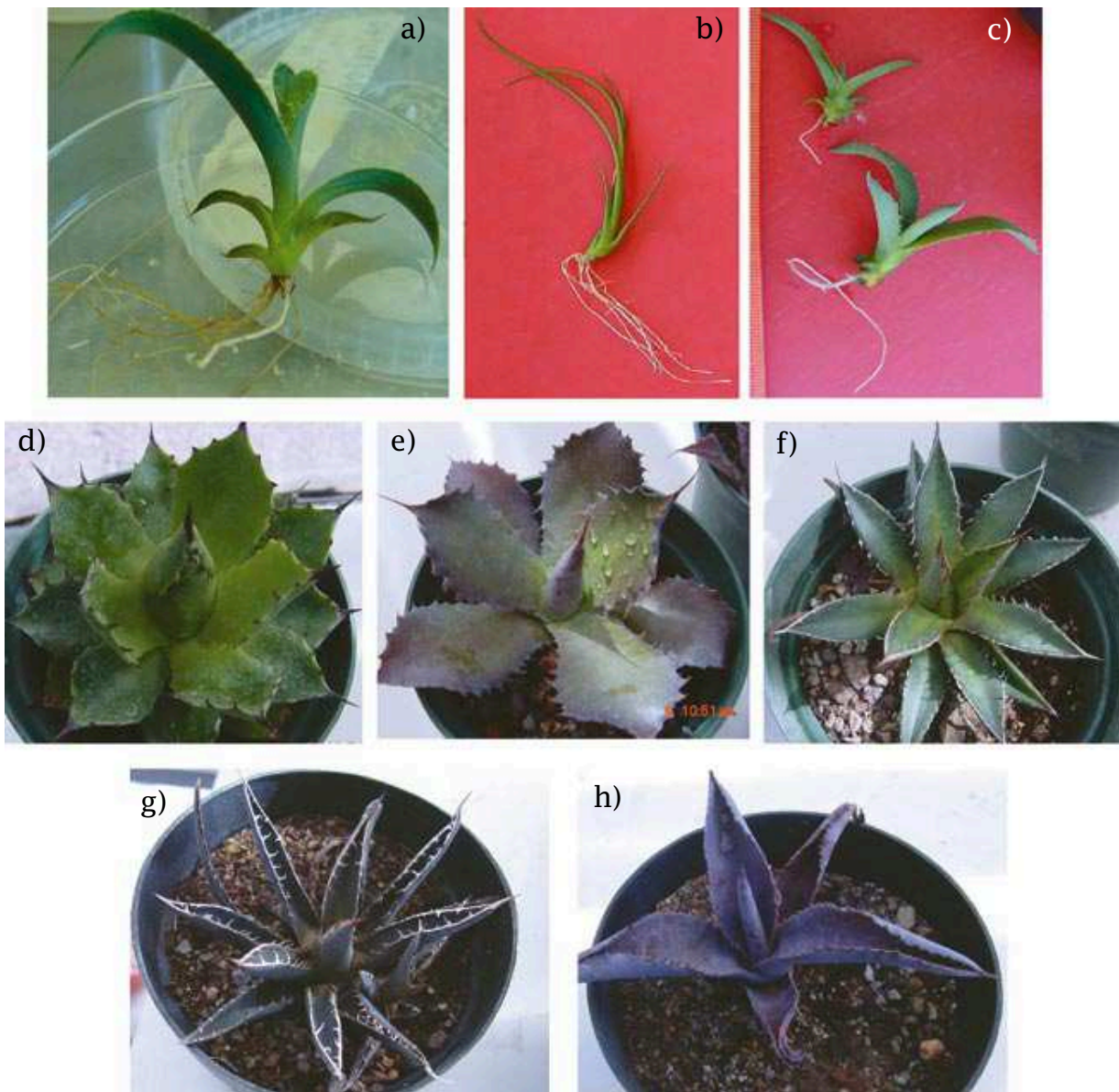


Figura 2. Enraizamiento y transferencia a suelo de plantas de Agave generadas *in vitro*. a) Brotes de *A. potatorum* enraizados *in vitro*; b) Brotes de *A. ornithobroma* enraizados *in vitro*; c) Brotes de *A. salmiana* enraizados *in vitro*, (Barra = 10 mm); d) Plántula de *A. cupreata* transferida a suelo; e) Plántula de *A. potatorum* transferida a suelo; f) Plántula de *A. obscura* transferida a suelo; g) Plántula de *A. difformis* transferida a suelo; h) Plántula de *A. karwinskii* transferida a suelo.



Figura 3. Organogénesis indirecta en *Agave*. a) Tejido calloso de *A. chiapensis*; b) Aparición de brotes en tejido calloso de *A. chiapensis*; c) Brotes en diferentes etapas de diferenciación generados en un cultivo de tejido calloso de *A. chiapensis*; d) Detalle de la generación de brotes sobre tejido calloso de *A. peacockii*; e) Masas de brotes de *A. victoria-reginae* desarrollados a partir de tejido calloso; y f) *A. ornithobroma*, brotes generados a partir de cultivo de tejido calloso. (Barra = 10 mm).

este caso una combinación de una citocinina con una auxina. En este medio se produce y prolifera primero tejido calloso, y es a partir de éste de donde se generan brotes en un segundo paso. Esto puede ocurrir espontáneamente en el mismo medio, o bien, puede requerirse de la transferencia del tejido a un medio sin reguladores del crecimiento. Los brotes generados a través de organogénesis pueden ser también enraizados, adaptados y transferidos a suelo. El número de brotes que se generan por esta vía de regeneración suele ser mucho mayor al obtenido a partir de tejidos meristemáticos. Sin embargo, el pasar por una etapa de tejido indiferenciado (callo) hace más probable el que se presenten variaciones genéticas o epigenéticas en el material y se obtengan plantas anormales o alteradas. Por este motivo, este método no es recomendable para la obtención de plantas que conserven las características genéticas originales de la especie,

pero sí puede ser interesante para la generación de variantes con valor agronómico u ornamental. Otro aspecto que se ha trabajado, es la conservación *in vitro* de estas especies de *Agave*, esto a través de la conservación de un banco de germoplasma de las mismas. Se han definido ya algunos medios de cultivo que retardan significativamente el crecimiento de los tejidos sin causar efectos negativos en la viabilidad de los mismos. De esta forma, las especies de *Agave* mencionadas en este apartado se han incorporado a un banco de germoplasma *in vitro* que ya mantenía 105 especies y variedades de cactáceas. Dicho banco está registrado en el Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe, editado por Bioversity International (Knudsen 2000), que es el instituto internacional más importante en lo referente a la conservación de los recursos vegetales del planeta.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDRIJANY, V.S., INDRAYANTO, G., SOEHONO, L.A. Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt ions on saponin steroids content in callus cultures of *Agave amaniensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 55, págs. 103-108, 1999.
- BINH, T. L., *et al.*, Rapid propagation of agave by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 23, págs. 67-70, 1990.
- DAS, T. Micropropagation of *Agave sisalana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 31, págs. 253-255, 1992.
- ENRÍQUEZ DEL VALLE, J.R., CARRILLO-CASTAÑEDA, G., RODRÍGUEZ DE LA O, J.L. Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 28, págs. 175-178, 2005.
- FLORES-BENÍTEZ, S., *et al.*, Genetic transformation of *Agave salmiana* by *Agrobacterium tumefaciens* and particle bombardment. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 91, págs. 215-224, 2007.
- GENTRY, H.S. 1982. *Agaves of Continental North America*. Tucson: The University of Arizona Press. 670 págs., 1982.
- GIL-VEGA, K., *et al.*, Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. *Azul* using RAPD markers. *Euphytica* 119, págs. 335-341, 2001.
- GRANADOS-SÁNCHEZ, D. 1993. *Los Agaves en México*. México: Universidad Autónoma Chapingo, 252 págs., 2001.
- GROENEWALD, E. G., WESSELS, D. C. J., KOELEMAN, A. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (Agavaceae). *Z Pflanzenphysiol* 21, 4, págs. 369-373, 1977.
- HAZRA, K. S., DAS, S., DAS, K. A. Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 70, págs. 235-240, 2002.
- KEB-LLANES, M., *et al.*, A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20, págs. 299a-299e, 2002.
- KNUDSEN, H., *Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe*. Roma: International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), 2000.
- LÓPEZ, M.G, MANCILLA-MARGALLI, N.A., MENDOZA-DÍAZ, G. Molecular structures of fructans from *Agave tequiliana* Weber var. *azul*. *J. Agric. Food Chem.* 51, págs. 7835-7840, 2003.
- MARTÍNEZ-PALACIOS, A., *et al.*, Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoriae-reginae*: Consideration for its Conservation. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 74, págs. 135-142, 2003.

- NIKAM, D. T. High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell, and Organ Culture*. 51, págs. 225-228, 1997.
- NIKAM, D. T., BANSUDE, M. G., ANEESH KUMAR, C. K., Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. Ex Engelm). *Plant Cell Rep.* 22, págs. 188-194, 2003.
- Norma Oficial Mexicana. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión o cambio-lista de especies en riesgo. NOM-059-Ecol-2001. Diario Oficial, miércoles 6 de marzo de 2002. págs. 158-169. México, D.F., 2001.
- PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E., *et al.*, *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes. 1999.
- POWERS, D.E., BACKHAUS, R.A., *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 16, págs. 57-60, 1989.
- ROBERT, M.L., *et al.*, *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 8, págs. 37-48, 1987.
- RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, G., *et al.*, Generación de raíces transformadas de *Agave salmiana* Otto y su colonización por *Glomus intraradices*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30, págs. 215-222, 2007.
- PORTILLO, L., *et al.*, Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant.* 43, págs. 569–575, 2007.
- RODRÍGUEZ-GARAY, B., GUTIÉRREZ-MORA, A., ACOSTA-DUEFIAS, B., Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 46: págs. 85-87, 1996.
- SANTACRUZ-RUVALCABA, F., GUTIÉRREZ-PULIDO, H., RODRÍGUEZ-GARAY, B., Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 56, págs. 163-167, 1999.
- SILOS-ESPINO, H., *et al.*, Chemical composition and *in vitro* propagation of *Agave salmiana* 'Gentry'. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 82, págs. 355-359, 2007.
- VALADEZ-MOCTEZUMA, E., KAHL, G., *Huellas de ADN en Genomas de Plantas*. México: Universidad Autónoma Chapingo / Mundi-Prensa, 147 pp., 2000.
- VALENZUELA-SÁNCHEZ, K.K., *et al.*, Plant Regeneration Of *Agave tequilana* by Indirect Organogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant.* 42, págs. 336–340, 2006.
- TEJAVATHI, D. H., *et al.*, Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* Mill. *In Vitro Cell.Dev. Biol.—Plant.* 43, págs. 423-428, 2007.