



REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *Agave marmorata* Roezl, VÍA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA †

[REGENERATION OF *Agave marmorata* Roezl PLANTS, BY SOMATIC EMBRIOGENESIS]

Carlos Alvarez-Aragón, Amaury Martín Arzate-Fernández*, Sandra Yarensy Martínez-Martínez and Irene Martínez-Velasco

Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas, Km 11.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, 50200, Toluca, Estado de México, México. Email.

amaury1963@yahoo.com.mx

*Corresponding author

SUMMARY

Background. *Agave marmorata* Roezl is a monocot plant of the Asparagaceae family, which is mainly used in the elaboration of the alcoholic drink called mezcal. This species is propagated by seeds or stolons (hijuelos), but its reproduction is slow because its maturation stage can last up to 35 years until flowering. Therefore, efficient and alternative propagation methods should be used to ensure the permanence of the resource. Biotechnology, in particular plant tissue culture techniques, represents a viable alternative for the propagation of this species, however, until now, there are no previous reports on the spread of *A. marmorata* Roezl, via somatic embryogenesis. **Objective.** Evaluate various treatments to regenerate seedlings of this species through somatic embryogenesis. **Methodology.** Callus induction was obtained from mature seeds established in MS (Murashige and Skoog, 1962) at 25%, supplemented with vitamins L2 (Phillips and Collins, 1979), 5 mg L⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic (2, 4-D), 3 mg L⁻¹ of 6-benzyladenine (BA), 60 g L⁻¹ of sucrose, 8 g L⁻¹ of agar and adjusted to a pH of 5.7 ± 0.1. These calluses were sectioned into small portions weighing approximately 0.25 g and were incubated in an MS medium at 50% of their concentration with 30 g L⁻¹ of sucrose, 8 g L⁻¹ of agar and subjected to eight concentrations of two plant growth regulators (RCV): BA (0.0, 2.0, 6.0 and 10 mg L⁻¹) and 2,4-D (0.0 and 5 mg L⁻¹), alone or combined, giving a total of eight treatments. Those explants that responded to the embryogenic callus formation were subcultured to 50% MS medium, 30 g L⁻¹ of sucrose and gelled with 8 g L⁻¹ agar where two RCV were evaluated independently (0.1 mg L⁻¹ of 2,4-D or 3 mg L⁻¹ of AG₃) and two culture conditions: 16 h light and 8 h dark and complete darkness, giving a total of 24 treatments. The variables evaluated in this work were: percentage of callus induction, percentage of embryogenic structures, number and growth of regenerated seedlings of *A. marmorata* Roezl at 255 ddic. **Results.** The best response was observed 120 days after starting the culture (ddic) in treatment five with 0.1 mg L⁻¹ of 2,4-D under light conditions where the pre-treatment was with 10 mg L⁻¹ of BA, obtaining 19.4 somatic embryos per explant. Maturation of somatic embryos in 50% MS medium was achieved with 30 g L⁻¹ of sucrose and 8 g L⁻¹ of agar, without RCV. The 100% of the regenerated seedlings survived and grew under greenhouse conditions. **Implications.** The results of this study contribute to a better understanding of the importance of a pretreatment with high concentrations of cytokinin (BA) and culture conditions, for the regeneration of *Agave marmorata* Roezl plants, via somatic embryogenesis. This can assist in the initiation of germplasm genetic improvement and *in vitro* conservation programs. **Conclusions.** The factors evaluated here were important in the induction and expression of embryogenic structures of this species, making possible the regeneration of seedlings of *A. marmorata* Roezl, from the formation of somatic embryos.

Index words: *Agave marmorata* Roezl; somatic embryogenesis; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; 6-benzyladenine.

RESUMEN

Antecedentes. *Agave marmorata* Roezl es una planta monocotiledónea de la familia de las Asparagaceae, que se utiliza principalmente en la elaboración de la bebida alcohólica llamada mezcal. La especie se propaga por semillas y estolones (hijuelos), pero su reproducción es lenta porque su etapa de maduración puede prolongarse hasta 35 años en forma silvestre. Por lo tanto, se deben utilizar métodos de propagación alternativos y eficientes que aseguren la permanencia del recurso. La biotecnología, en particular las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, representa una alternativa viable para la propagación de esta especie, así la embriogénesis somática es considerada una poderosa herramienta biotecnológica para la regeneración y mejoramiento genético de plantas. A la fecha, no hay reportes previos sobre la propagación de *A. marmorata* Roezl, vía embriogénesis somática. **Objetivo.** Evaluar diversos

† Submitted December 9, 2019 – Accepted March 18, 2020. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License. ISSN: 1870-0462.

tratamientos para regenerar plántulas de esta especie a través de embriogénesis somática. **Metodología.** La inducción de callo se obtuvo a partir de semillas maduras establecidas en MS (Murashige y Skoog, 1962) a 25 %, suplementados con vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), 5 mg L⁻¹ de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 3 mg L⁻¹ de 6-benciladenina (BA), 60 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar y se ajustó a un pH de 5.7 ± 0.1. Estos callos se seccionaron en porciones pequeñas con peso aproximado de 0.25 g y se incubaron en un medio MS a 50 % de su concentración con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar y se sometieron a ocho concentraciones de dos reguladores de crecimiento vegetal (RCV), BA (0.0, 2.0, 6.0 y 10 mg L⁻¹) y 2,4-D (0.0 y 5 mg L⁻¹), solos o combinados, dando un total de ocho tratamientos. Aquellos explantes que respondieron a la formación de callo embriogénico se subcultivaron a medio MS a 50%, 30 g L⁻¹ de sacarosa y gelificado con 8 g L⁻¹ de agar donde se evaluaron dos RCV, de forma independiente, (0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 3 mg L⁻¹ de AG₃) y dos condiciones de cultivo: 16 h luz y 8 h de oscuridad y oscuridad completa, dando un total de 24 tratamientos. Las variables evaluadas en este trabajo fueron: porcentaje de inducción de callo, porcentaje de estructuras embriogénicas, número y crecimiento de plántulas regeneradas de *A. marmorata* Roezl a los 255 ddic. **Resultados.** La mejor respuesta se observó a los 120 días después de iniciado el cultivo (ddic) en el tratamiento cinco con 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D bajo condiciones de luz donde el pretratamiento fue con 10 mg L⁻¹ de BA, obteniendo 19.4 embriones somáticos por explante. Se logró la maduración de los embriones somáticos en el medio MS a 50% con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar, sin RCV. El 100 % de las plántulas regeneradas sobrevivieron y crecieron en condiciones bajo invernadero. **Implicaciones.** Los resultados de este estudio contribuyen a una mejor comprensión de la importancia de un pretratamiento con altas concentraciones de citocinina (BA) y las condiciones de cultivo, para la regeneración de plantas de *Agave marmorata* Roezl, vía embriogénesis somática. Esto puede ayudar al comienzo de los programas de mejoramiento genético y conservación *in vitro* de germoplasma. **Conclusiones.** Los factores aquí evaluados fueron importantes en la inducción y expresión de estructuras embriogénicas de esta especie, haciendo posible la regeneración de plántulas de *A. marmorata* Roezl, a partir de la formación de embriones somáticos. **Palabras clave:** *Agave marmorata* Roezl; embriogénesis somática; 2,4-diclorofenoxiacético; benciladenina.

INTRODUCCIÓN

Entre las plantas más representativas del paisaje mexicano, en especial de las zonas áridas y semiáridas de México, están los agaves o magueyes, considerados especies clave en esas regiones, tanto por su abundancia como por la cantidad de recursos que proporcionan a otros organismos. De sus aproximadamente 200 especies, 150 de estos se encuentran en México representando el 75% a nivel mundial (García-Mendoza, 2007).

De la planta se pueden obtener bebidas alcohólicas (tequila y mezcal), fermentadas (pulque), alimentos, forraje para rumiantes, fibras, material de construcción, papel y productos terapéuticos, entre otros (Méndez-Gallegos *et al.*, 2011).

De acuerdo con el Consejo Regulador del Mezcal (2018), la producción de esta bebida fue superior a los 5 millones de litros, 92.3 % producidos en Oaxaca, donde se generaron 19,000 empleos directos y más de 85,000 empleos indirectos lo cual ha permitido que disminuya la migración. La importancia de la industria del mezcal en la economía es sin duda significativa tanto en términos de su contribución al Producto Interno Bruto (PIB) manufacturero como en términos de generación de empleos y de divisas (Ramales y Ortiz, 2009).

El mezcal puede elaborarse aproximadamente con 14 distintos tipos de *Agave*, como es el caso de agave Tepeztate (*Agave marmorata* Roezl), su nombre se deriva del vocablo “*Tepetl*” que en náhuatl significa

montaña o monte, haciendo referencia a los lugares donde se le puede encontrar que generalmente es en acantilados. Al ser un agave endémico y específicamente de Oaxaca, se encuentran en selvas bajas y matorrales de la Sierra Madre del Sur, desde el extremo oriental del Balsas hasta el Istmo de Tehuantepec. Los tallos y las inflorescencias jóvenes de esta especie se comen horneadas, el jugo ya sea el mezcal o pulque se calienta para curar la tos, úlceras, coágulos, asma, golpes y heridas, las flores sirven como forraje para el ganado, como ornamento en los arreglos de Semana Santa, especialmente el de la Virgen de Dolores en algunas poblaciones de Oaxaca (García-Mendoza, 2011). Además, es uno de los agaves que tienen la etapa de maduración más longeva de todas las especies de agaves mezcaleros, ya que puede prolongarse hasta 35 años en forma silvestre y el gusto por las flores, en caso de ser cortadas antes del trabajo de los polinizadores complicaría la reproducción. Lo mismo ocurre cuando se cortan los ejemplares antes de que quiten y puedan aprovecharse sus semillas (Nogales, 2017), y aunado a la creciente demanda de materia prima para abastecer la producción de mezcal ha generado la sobreexplotación de las especies de agaves silvestres teniendo graves afectaciones a los ecosistemas. Por lo tanto, se requieren acciones que aseguren la permanencia del recurso y permitan la planeación de áreas para su aprovechamiento sustentable (Domínguez *et al.*, 2008).

La biotecnología vegetal puede ser una alternativa para subsanar lo relativo al esquema de propagación a gran escala, así la embriogénesis somática (ES) es

considerada una poderosa herramienta biotecnológica para la regeneración y mejoramiento genético de plantas, ya que puede ser inducida en forma directa sobre el explante o indirectamente a partir de callo, siguiendo un patrón de desarrollo similar al de un embrión de origen cigótico (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011), a diferencia de la organogénesis la embriogénesis somática posee estructuras bipolares con un eje radial apical que no tiene conexión vascular con el tejido madre, el cual es capaz de crecer y formar individuos totalmente normales (Litz y Jarret, 1991).

La ES es la formación de un embrión a partir de una célula o grupo de células no sexuales. Los embriones somáticos se pueden obtener de células vegetativas, de tejidos reproductivos, de embriones cigóticos o de callos producidos de cualquiera de las partes de las plantas (Copeland y McDonald, 1995). La ES es una técnica muy útil de propagación y constituye una herramienta de trabajo para la conservación *in vitro* de germoplasma (Monja-Mio y Robert, 2013) y el mejoramiento genético (Das *et al.*, 2002). Este método, teóricamente, es el más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*, debido a la posibilidad de ser automatizado todo el proceso productivo, los altos coeficientes de multiplicación en cortos periodos de tiempo y la posibilidad de encapsular estas estructuras y obtener semillas artificiales (Freire-Seijo, 2003; Arzate-Fernández *et al.*, 2016).

Todo el proceso es afectado por una serie de factores como los físicos (luz y temperatura), químicos (nutrientes y reguladores del crecimiento) y biológicos (fisiológicos y genéticos) (Fehér *et al.*, 2003), siendo específicos para cada especie, variedad o incluso línea genética (Monja-Mio y Robert, 2013). De esta forma, los objetivos del presente trabajo fueron: a) evaluar el efecto de cuatro concentraciones de 6-benciladenina (BA) y dos de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en la inducción de estructuras embriogénicas; b) evaluar el efecto de las condiciones de cultivo (luz y oscuridad) y el efecto del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido giberélico (AG₃) de forma independiente en la maduración de estructuras embriogénicas; c) aclimatar a condiciones *ex vitro* las plantas de *Agave marmorata* Roezl, regeneradas en el laboratorio mediante el proceso de embriogénesis somática; y d) caracterizar, mediante las técnicas histológicas, el origen celular de los embriones somáticos de *Agave marmorata* Roezl.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico experimental

Las semillas maduras de *Agave marmorata* Roezl (Am), usadas en la presente investigación se colectaron de plantas establecidas en campo, donadas por el

Centro Regional Universitario Sur Oaxaca, Programa Maguey-Mezcal, de la Universidad Autónoma de Chapingo (UACh).

Desinfección de las semillas

Las semillas de Am fueron sumergidas y enjuagadas a chorro de agua corriente por 15 minutos (min) en una solución jabonosa (2 mL de jabón líquido para trastes de la marca KIRKLAND diluidos en 80 mL de agua), con tres gotas de Tween 20 ®. En campana de flujo laminar para trabajar de manera aséptica, las semillas se sumergieron en etanol 70% durante 1 min y en hipoclorito de sodio a 1% por 15 min, en constante agitación, finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada y se dejaron estratificar por 24 h a 4-6°C.

Embriogénesis somática

La obtención de embriones somáticos se llevó a cabo en cuatro etapas, a saber:

Etap 1. Inducción de callo embriogénico. El medio de cultivo para la formación de callo (MI), consistió en sales MS (Murashige y Skoog, 1962) a 25 %, suplementados con vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), 5 mg L⁻¹ de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 3 mg L⁻¹ de benciladenina (BA), 60 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar. El pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCl 1.0 N, antes de adicionar el agar, después se esterilizó a temperatura de 121°C y 1.1 Kg cm⁻² de presión por 20 min. El medio se vertió en cajas Petri (25 mL), en cada caja se establecieron 10 semillas que se incubaron en completa oscuridad a una temperatura de 25°C por 60 días (d) hasta la inducción de callo.

Posteriormente para inducir callo embriogénico, los callos se seccionaron en porciones de 0.25 g de peso aproximadamente y se transfirieron a frascos gerber con 30 mL de medio de cultivo MS a 50 %, con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar. En estos tejidos se evaluó el efecto de dos reguladores de crecimiento vegetal (RCV), los cuales consistieron en cuatro concentraciones de la citocinina BA (0.0, 2.0, 6.0 y 10 mg L⁻¹) y dos concentraciones de auxina 2,4-D (0.0 y 5 mg L⁻¹), solos y/o combinados, dando un total de ocho tratamientos con seis repeticiones por tratamiento y seis secciones de callo en cada repetición: como testigo se consideró el tratamiento sin RCV. Todos los tratamientos fueron expuestos a condiciones de luz provista por lámparas de luz blanca fluorescentes (33 µmol m⁻²s⁻¹) e incubados a 25 ± 1°C por 30 d.

Etap 2. Maduración de embriones somáticos. Para la fase de maduración de embriones somáticos, se usaron aquellos explantes de cuyos tratamientos se logró inducir callo embriogénico, a saber: 6:0, 10:0,

0:5, 2:5, 6:5, 10:5 mg L⁻¹ de BA:2,4-D, respectivamente. Así, los callos embriogénicos se transfirieron a frascos gerber con 30 mL de medio cultivo MS a 50%, con 30 g L⁻¹ de sacarosa y gelificado con 8 g L⁻¹ de agar donde se evaluaron dos RCV de forma independiente y consistió en: 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D y 3 mg L⁻¹ de AG₃, y dos condiciones de cultivo: 16 h luz y 8 h de oscuridad, con luz provista por lámparas de luz blanca fluorescentes (33 μmol m⁻²s⁻¹) y oscuridad completa, dando un total de 24 tratamientos con seis secciones de callo en cada tratamiento. Los explantes fueron incubados a 25 ± 1°C por 30 d.

Etapas 3. Germinación. Los embriones somáticos en fase escutelar (199) se transfirieron a frascos de plástico con 70 mL de medio MS a 50%, enriquecido con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 8 g L⁻¹ de agar, libre de RCV y fueron expuestos a condiciones de luz provista por lámparas de luz blanca fluorescentes (33 μmol m⁻²s⁻¹) e incubados a 25 ± 1°C por 30 d. A fin de promover su germinación y así lograr la regeneración de plántulas.

Etapas 4. Aclimatación y crecimiento de plántulas regeneradas a condiciones *ex vitro*. Se seleccionaron 80 plántulas de un tamaño de 3.7 cm con 4 hojas verdaderas y con una longitud de raíz de 3.5 cm, estas fueron lavadas con agua corriente para eliminar todo residuo de agar. Cada plántula fue colocada en un cilindro de espuma fenólica (peatFOAM®) de 22 mm x 36 mm, y posteriormente en charolas de 80 cavidades. Las charolas se colocaron en un sistema de raíz flotante con una solución nutritiva Hydro-Solution (GrowCare®) dentro de una cubierta plástica (microtúnel), en donde las condiciones fueron: 50% de humedad y entre 20-35 °C de temperatura durante tres semanas. Posteriormente de las tres semanas el 50 % de las plántulas fueron transferidas cada una a un vaso de plástico de 300 ml de capacidad con tepojal como sustrato, con partículas de aproximadamente 2.5 mm de diámetro y se colocaron en un sistema semi-hidropónico con una frecuencia de riego de 3 min en la mañana los lunes, miércoles, viernes y 3 min en la tarde los martes, jueves, sábados y el otro 50 % de las plántulas, cada una se estableció en bolsas negras de polietileno de 10 x 15 cm, en un sustrato compuesto por tierra agrícola y agrolita (1:1) con una frecuencia de riego de tres días a la semana.

Análisis histológico

A fin de corroborar el origen celular de los embriones somáticos, se tomaron muestras de callo embriogénico, se hicieron cortes transversales de 10 μm y se montaron en resina sintética, de acuerdo con la metodología propuesta por Sass (1958). Los cortes histológicos se analizaron bajo un microscopio óptico compuesto Axioskop 2 (Zeiss®) acoplado a un sistema de captura digital de imágenes AxioCam MRc5.

Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron las siguientes:

Porcentaje de estructuras embriogénicas: ([Número de explantes con respuesta]* [100]/ 6 = % de estructuras embriogénicas).

Promedio de embriones somáticos formados por explante: Se contaron los embriones en estado escutelar a los 120 ddc por cada explante con ayuda de un microscopio estereoscópico y se dividieron entre el número de explantes que respondieron favorablemente.

Porcentaje de plántulas aclimatadas: Se aplicó una regla de tres ([Número de plántulas sobrevivientes]*[100]/Número total de plántulas aclimatadas a condiciones *ex vitro*=% de plántulas aclimatadas).

Crecimiento de plántulas: Se determinó la media de las siguientes variables; número de hojas, altura (cm), diámetro del tallo (mm), número y longitud de raíces de las plántulas establecidas en sistema semi-hidropónico y bolsas negras de polietileno con un sustrato compuesto por tierra agrícola y agrolita (1:1).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos sobre el número de embriones somáticos inducidos por explante se sometieron a un análisis de varianza con ayuda del software *Statgraphics* versión 5.0 y en donde hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados se realizó una prueba de comparación de medias de (LSD) con un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Embriogénesis somática

Etapas 1. Inducción de callo embriogénico. En el presente trabajo la emergencia del embrión cigótico inició a los 5 ddc (Figura 1A). La desdiferenciación de los embriones cigóticos inició con la formación de callo en forma de bellota a los 9 ddc (Figura 1B), resultado similar a lo reportado por (Arzate-Fernández y Mejía-Franco, 2011) con 3.0 mg L⁻¹ de 2,4-D y 1.0 mg L⁻¹ de BA en *A. angustifolia*. Así mismo las masas callosas obtenidas presentaron un diámetro de 10 y 20 mm con un peso de 0.5 g a los 60 ddc (Figura 1C), destacando que el 100 % de los explantes respondieron favorablemente al tratamiento. Reportes previos han señalado el papel que juegan las auxinas y citocininas en la formación de callo, así como su concentración en diferentes variedades de agave. Por ejemplo,

Groenewald *et al.* (1977) lograron aumentar la tasa de formación de callo en especies de *Agave* al incrementar el nivel de 2,4-D en presencia de cinetina, mientras que en *A. victoria-reginae* (Martínez-Palacios *et al.*, 2003), en *A. fourcroydes* (Robert *et al.*, 1987) y en otras plantas monocotiledóneas (Li *et al.*, 2006), las bajas concentraciones de citoquininas en el medio de cultivo, particularmente BA, favorecieron la formación y crecimiento del callo.

En aquellos tratamientos para la inducción de callos embriogénicos, se observó que en seis de los ocho tratamientos evaluados hubo una respuesta de un 40 a 100 % (Tabla 1). Se sabe que las hormonas desempeñan un papel importante en el control en la respuesta morfogenética de los cultivos *in vitro*. Dado a esto, el tratamiento sin reguladores de crecimiento vegetal y el que contenía 2.0 mg L⁻¹ de BA (Figura 1D) formaron estructuras rizogénicas a los 75 ddc. Mientras el tratamiento donde se usaron altas concentraciones de BA (6.0 y 10.0 mg L⁻¹) comenzaron a formarse directamente de la superficie del callo estructuras globulares semicompactas, friables de una coloración verdosa a los 80 ddc (Figura 1E). Esta coloración se le puede atribuir al efecto de las altas concentraciones de citoquininas que mejoran la síntesis de clorofila en las plantas (George, 1993; Zaffari *et al.*, 1998). De igual manera se ha reportado que el uso de altas concentraciones de citoquininas ha provocado la inducción de estructuras embriogénicas como es el caso de palma aceitera (Sidky y Zaid, 2011) y *A. sisalana* (Das, 1992; Nikam *et al.*, 2003), debido a que los efectos de las citoquininas en las plantas están relacionados principalmente en la capacidad de estimular la división y la diferenciación celular (Jordan y Casaretto, 2006). Mientras que los tratamientos en combinación con BA y 2,4-D (6.0:5.0 y 10.0:5.0 mg L⁻¹, respectivamente), formaron estructuras nodulares muy pronunciadas de un color distintivo a los obtenidos con altas concentraciones de citoquininas. En este caso, las estructuras globulares no produjeron clorofila y presentaron un color cremoso perlado (Figura 1F), observándose en el 100 % de los explantes a los 80 ddc. Santos-Cameiro *et al.* (2014) menciona que las auxinas son capaces de iniciar la división celular y controlar los procesos de crecimiento y alargamiento celular. El 2,4-D tiene un efecto sobre el metabolismo del ARN, induciendo la transcripción de ARN mensajero capaz de codificar proteínas de crecimiento que pueden inducir la proliferación celular desordenada, sin embargo, la inclusión de citoquininas

en el medio de cultivo permite formar callos en varias especies vegetales, aunque principalmente induce que la región meristemática multicelular se diferencie en estructuras organizadas (Freire-Seijo, 2003).

Etapas 2. Maduración de embriones somáticos.

Como se puede observar en la Tabla 1, la ES se vio afectada positivamente por las altas concentraciones de BA, obteniendo embriones somáticos solo en los tratamientos que fueron pretratados con una alta concentración de esta citocinina (6 y 10 mg L⁻¹), los embriones somáticos se observaron fácilmente sobre la superficie de los callos, tanto en condiciones de luz como en oscuridad, sin embargo difieren considerablemente de color y forma con respecto de las condiciones donde se generaron (Figura 2A y 2B). El tratamiento en donde se observó la tasa más alta de formación de embriones somáticos (19.4) fue con 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D bajo condiciones de luz y con un pretratamiento de 10 mg L⁻¹ de BA, esto se puede deber a que las citoquininas incrementa la sensibilidad del tejido al estímulo de la auxina y en este incremento la sensibilidad favorece la diferenciación celular, ambos reguladores participan en la dinámica del ciclo celular, importante en el proceso de diferenciación y posterior desarrollo de embriones somáticos (Monsalve-Gonzales *et al.*, 2005), en contraste, al tratamiento número siete que consistió en la misma concentración del 2,4-D, pero bajo condiciones de oscuridad la capacidad de maduración disminuyó generando 2.2 embriones somáticos. Este contraste se puede deber a que las citoquininas y la luz pueden provocar respuestas morfológicas y bioquímicas similares en una amplia gama de especies de plantas o interactuar de otro modo en el control de los procesos de dediferenciación y rediferenciación *in vitro* (Ivanova *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1997; Karnachuk y Gvozdeva, 1998; Kintzios *et al.*, 2000). Se ha reportado que concentraciones altas de citocinina (66.6 µM de BA) mostraron un mejor desempeño produciendo 151 embriones somáticos en el genotipo S3 en *Agave tequilana* (Portillo *et al.*, 2007). En *A. fourcroydes* Lem (Monja-Mio y Robert, 2013) explantes de la región apical del tallo, pretratados con 44.4 µM de BA indujo 35 embriones a diferencia de los que no estuvieron a exposición de BA produciendo 15 embriones y en *Coffea arabica* (Papanastasiou *et al.*, 2008) tratamientos previos en medio líquido con 50 µM BA fue esencial para el inicio de la ES. Por otro lado, el tratamiento ocho que se sometió a 3.0 mg L⁻¹ de AG₃ bajo condiciones de oscuridad, y un pretratamiento de 10 mg L⁻¹ de BA formaron 15.2 embriones somáticos (Tabla 1). Se sabe que el AG₃ modifica el ARN producido en los núcleos, y así puede ejercer su control sobre la expansión

celular, favoreciendo la maduración y aumento de la calidad de los embriones somáticos, así como otras actividades de crecimiento y desarrollo vegetal (Escalada-Aldaz, 2014). También ha sido señalado que una cantidad muy alta de AG_3 (25 mg L^{-1}) en *Crocus heuffelanus*, ayuda a la regeneración de embriones somáticos (Demeter *et al.*, 2010), así mismo en Yuca (*Manihot esculenta*) la adición de 1 mg L^{-1} de AG_3 indujo la maduración de embriones somáticos utilizando yemas axilares como explante (Medero *et al.*, 2000), en cambio el tratamiento seis que consistió con los mismos RCV, pero bajo condiciones de luz no hubo repuesta. Se sabe que el AG_3 es fotosensible, teniendo un mejor efecto en el estímulo morfogénético en los explantes al ser cultivados en oscuridad.

Etapas 3. Germinación. Se logró un 100 % de germinación de los embriones somáticos en fase escutelar (Figura 2C) obtenidos de los tratamientos 1, 5, 7 y 8. Los embriones somáticos germinados (Figura 2D) se parecían a sus contrapartes cigóticas (Figura 2E), dando lugar a plántulas de una morfología normal (Figura 3B). La germinación inició con el desarrollo de la parte apical y posteriormente el sistema radicular; estas vitroplantas alcanzaron una altura de 3.5 a 3.7 cm a los 30 d (Figura 2D). La eficacia de conversión de embriones germinados a plántulas fue tan alta de un 95 a 100 %, resultado similar a lo reportado por Portillo *et al.* (2007).

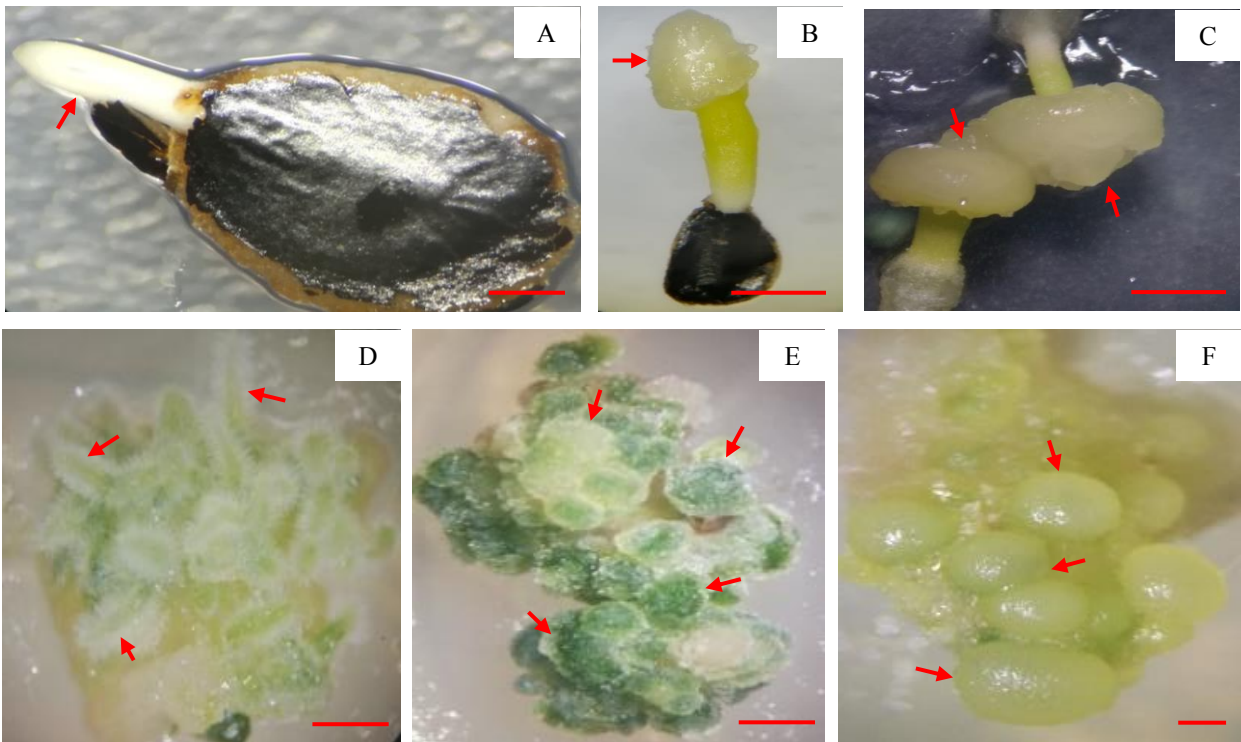


Figura 1. Inducción de callo embriogénico de *Agave marmorata* Roehl. (A) Embrión cigótico emergiendo de la semilla a los 5 ddc (flecha); barra=1 mm. (B) Desdiferenciación celular del embrión cigótico a los 9 ddc (flecha); barra=0.5 cm. (C) Masas callosas a los 60 ddc (flechas) en el medio de cultivo para la inducción de callo (MI); barra=0.5 cm. (D) Callo con numerosas raíces (flechas) a partir de los 75 ddc en el tratamiento con 2.0 mg L^{-1} de BA; barra=1 cm. (E) Callo con estructuras nodulares compactas de aspecto friable y de color verde (flechas) a partir de los 80 ddc en el tratamiento con 10 mg L^{-1} de BA; barra=0.5 cm. (F) Callo con estructuras nodulares muy pronunciadas de un color amarillo perlado (flechas) a partir de los 80 ddc en el tratamiento con $10:5 \text{ mg L}^{-1}$ de BA:2,4-D; barra=0.5 cm.

Tabla 1. Número de embriones somáticos obtenidos en los tratamientos de expresión en *Agave marmorata* Roehl.

Tratamientos	Pretratamiento para la inducción de callo embriogénico (mg L ⁻¹)		Porcentaje de estructuras embriogénicas	Condiciones de cultivo	Tratamientos para la maduración de embriones somáticos (mg L ⁻¹)		No. de ES*
	BA	2,4-D			AG ₃	2,4-D	
1				L	0	0.1	3 ^C
2	6	0	100		3	0	0 ^E
3				O	0	0.1	0 ^E
4					3	0	0 ^E
5				L	0	0.1	19.4 ^A
6	10	0	100		3	0	0 ^E
7				O	0	0.1	2.2 ^D
8					3	0	15.2 ^B
9				L	0	0.1	0 ^E
10	0	5	40		3	0	0 ^E
11				O	0	0.1	0 ^E
12					3	0	0 ^E
13				L	0	0.1	0 ^E
14	2	5	60		3	0	0 ^E
15				O	0	0.1	0 ^E
16					3	0	0 ^E
17				L	0	0.1	0 ^E
18	6	5	100		3	0	0 ^E
19				O	0	0.1	0 ^E
20					3	0	0 ^E
21				L	0	0.1	0 ^E
22	10	5	100		3	0	0 ^E
23				O	0	0.1	0 ^E
24					3	0	0 ^E

*Letras iguales significa que no hay diferencia estadísticamente significativa (P<0.05), usando la prueba de LSD.

Etapla 4. Aclimatación y crecimiento de plantas regeneradas por ES. Después de tres semanas de adaptación se contabilizó un 100% de sobrevivencia. Reportes previos han señalado que diferentes especies de *Agave* no presentan complicaciones para su adaptación *ex vitro* y alcanzan rangos de éxito de 90 a 100 % (Portillo *et al.*, 2007; Aureoles-Rodríguez *et al.*, 2008; Tejavathi *et al.*, 2007; Salazar *et al.*, 2009). Se observó que las plantas que fueron transferidas al sistema semi-hidropónico mostraron un mejor desarrollo con una altura de 7 cm, presentando 6 hojas,

un diámetro de tallo de 15 mm con 10 raíces de una longitud de 9.5 cm a los 255 ddc (Figura 3A). Mientras las que se transfirieron a bolsas negras alcanzaron una altura de 4.5 cm, formaron 4 hojas, un diámetro de tallo de 9 mm y 4 raíces de una longitud de 3.7 cm (Figura 3A) esto se debe que en el sistema semi-hidropónico las plantas al asimilar mayor cantidad de nutrientes, tuvieron mayor capacidad de síntesis de compuestos estructurales y metabólicos, lo que se tradujo en mayor crecimiento. Así, la fertilización proporcionó mayor disponibilidad de

nutrimentos minerales a las plantas, por lo que pudieron aumentar su capacidad fotosintética para la fijación de CO₂ y la acumulación de biomasa (Enríquez-del Valle *et al.*, 2013).

Análisis histológico

El estudio histológico sobre el origen de los embriones somáticos en *A. marmorata* Roezl mostró que los callos nodulares consistían en una masa de pequeñas células densas, formando grupos multicelulares dentro del callo y en la superficie del mismo (Figura 4A y 4B). Estos grupos se organizaron para formar una estructura de forma globular considerada como un preembrión de origen multicelular (Figura 4C), que después permitió dar origen a un embrión somático. La aparición del

grupo de células embriónicas indicó el origen multicelular del embrión, como ocurre en *Agave sisalana* (Nikam *et al.*, 2003), *Agave veracruz* (Tejavathi *et al.*, 2007). Aunque otras referencias señalan el incuestionable origen unicelular de los embriones en varios cultivos (Street y Withers, 1974; Haccius, 1977), pero también ha quedado claro que el embrión puede tener un origen multicelular (Williams y Maheswaran, 1986). La masa proembriónica de células formadas a partir de los grupos multicelulares tienen una orientación bipolar que carece de una conexión vascular con el tejido calloso (Figura 4E). El embrión formado en la superficie se mantiene unido al callo durante su iniciación, pero se desprende en etapas posteriores a su desarrollo (Figura 2C y 2D).

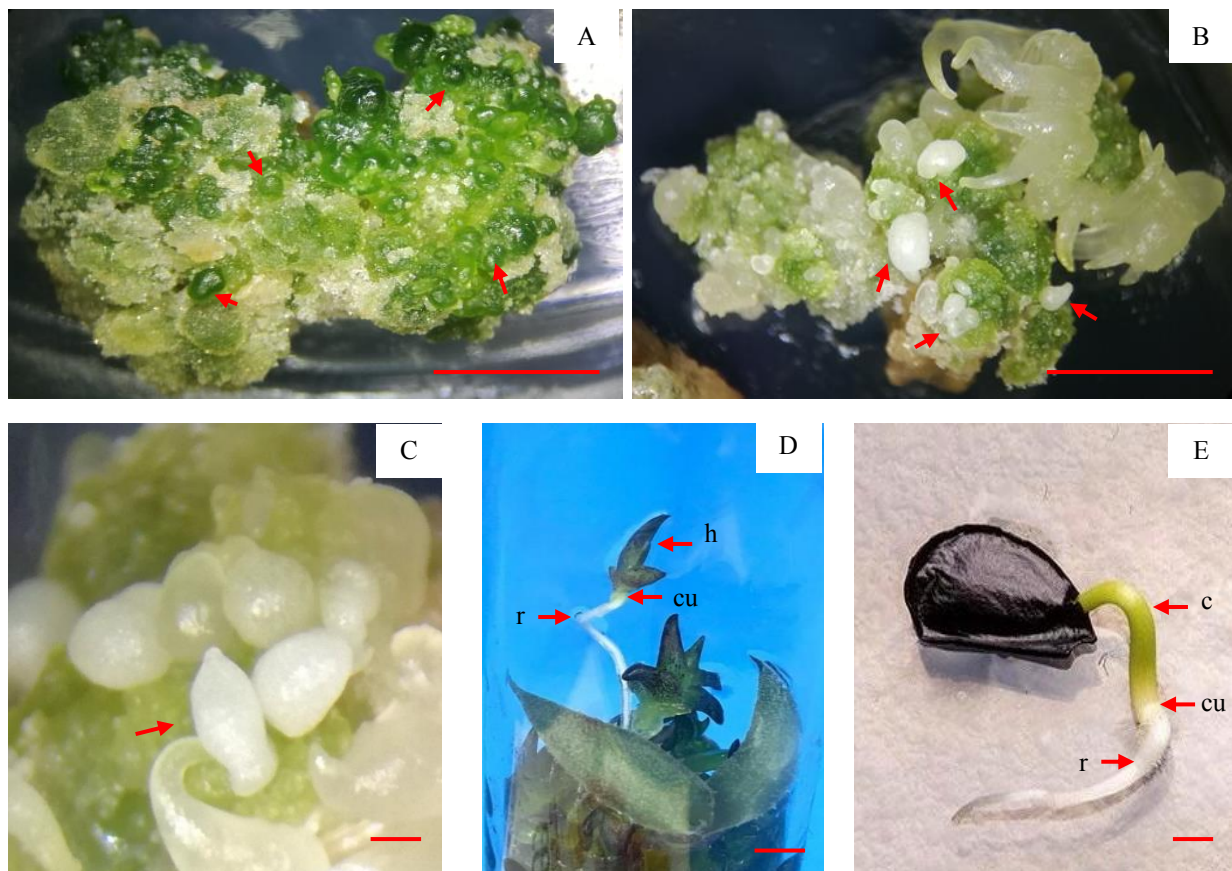


Figura 2. Maduración y germinación de embriones somáticos de *Agave marmorata* Roezl. (A) Embriones somáticos en estado globular a los 105 ddc (flechas) con 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D, y con un pretratamiento de 10 mg L⁻¹ de BA bajo condiciones de luz; barra=0.5 cm. (B) Embriones somáticos en estado globular y escutelar a los 105 ddc bajo condiciones de oscuridad en el medio con 3 mg L⁻¹ de AG₃ y con un pretratamiento de 10 mg L⁻¹ de BA; barra = 0.5 cm. (C) Embrión en estado escutelar a los 105 ddc (flecha); barra= 1 mm. (D) Embrión somático germinando suspendido debido a la fuerza que ejerce la raíz sobre el conglomerado de otros embriones somáticos en el medio de cultivo, a diferencia de una plántula que derive de un explante esta se mantendría unida y en consecuencia no le permitirá suspenderse además se puede observar una única raíz y la parte apical característico de la bipolaridad de un embrión somático; barra=1 cm. *h* hoja; *r* raíz *cu* cuello. (E) Embrión cigótico germinando, nótese la presencia de la zona del cuello que conecta a la raíz y su cotiledón mostrando la bipolaridad del embrión comparándolo con la Figura 1J; barra=1 mm. *c* cotiledón; *r* raíz; *cu* cuello.

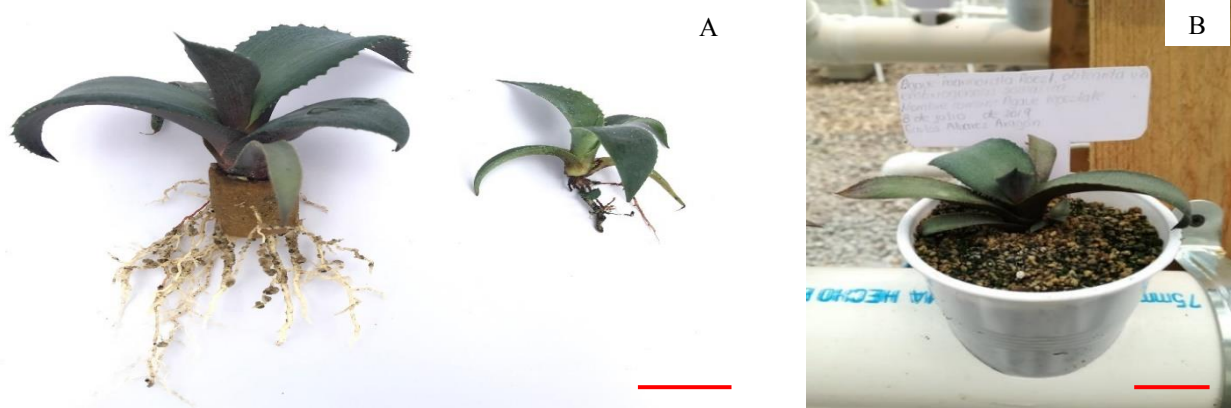


Figura 3. Aclimatación de plantas de *Agave marmorata* Roezl regeneradas vía ES. (A) Comparación entre una plántula desarrollada en sistema semi-hidropónico (izquierda) mostrando mayor desarrollo radicular y una desarrollada en un sustrato compuesto por tierra agrícola y agrolita (1:1) mostrando un sistema radicular menor (derecha) a los 255 ddc nótese la diferencia en el tamaño de la planta; barra= 2 cm. (B) Aspecto de una plántula de *Agave marmorata* Roezl adaptada a los 255 ddc en el sistema hidropónico regenerada vía ES; barra = 1.5 cm.

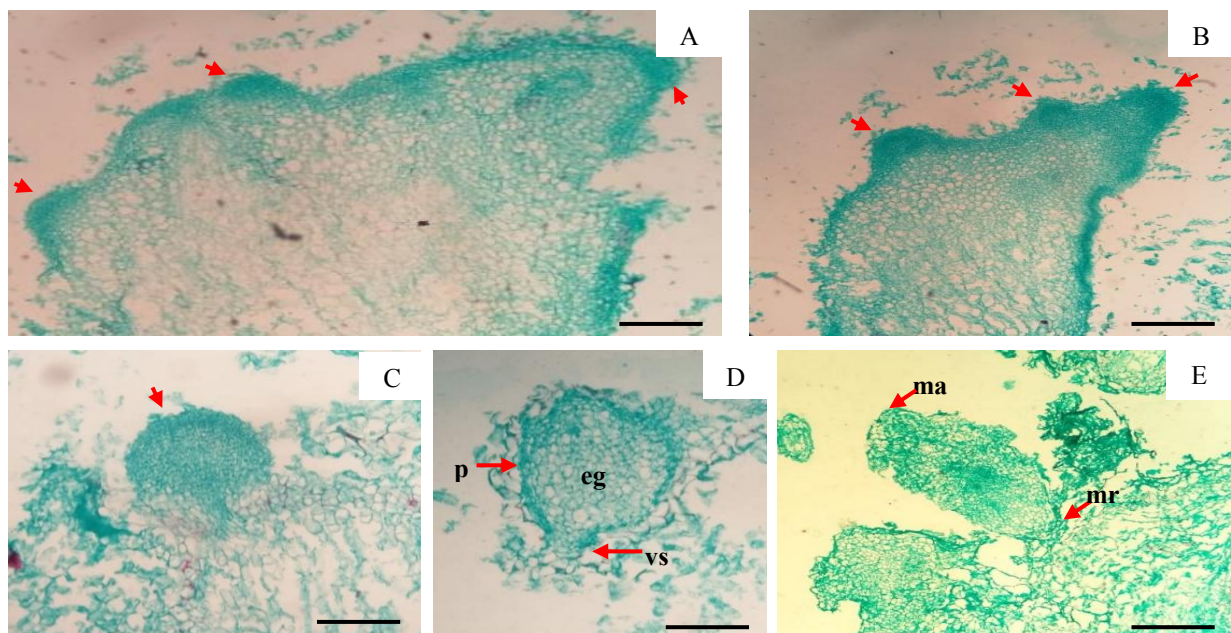


Figura 4. Estudio histológico del callo y estructuras embriónicas de *Agave marmorata* Roezl. (A) Grupo de células embriónicas (flechas) en la superficie del tejido calloso; barra=350 μ M. (B) Grupo de células dando origen a estados globulares (flechas) en una etapa temprana; barra=350 μ M. (C) Embrión globular de origen multicelular (flecha); barra=200 μ M. (D) Embrión globular (eg) con vestigio del suspensor (flecha); barra=200 μ M. (E) Embrión careciendo de una conexión vascular con el tejido calloso; barra=200 μ M. *p* protodermo; *eg* embrión globular; *vs* vestigio de suspensor; *ma* meristemo apical; *mr* meristemo radical.

CONCLUSIONES

Fue posible la regeneración de plántulas de *A. marmorata* Roezl, a partir de la formación de embriones somáticos. Los factores aquí evaluados fueron importantes en la inducción y expresión de estructuras embriogénicas de esta especie. El tratamiento en donde se obtuvo la tasa de formación de embriones somáticos más alta fue el cinco que consistió en 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D, bajo condiciones de luz y con un pretratamiento de 10 mg L⁻¹ de BA, obteniendo una media de 19.4 embriones somáticos en una sección de callo de aproximadamente 0.25 g. Todas las plántulas regeneradas se adaptaron a condiciones *ex vitro*, logrando un mayor desarrollo las que se sometieron al sistema semi-hidropónico a los 255 ddic.

Agradecimientos

El autor Carlos Alvarez Aragon agradece a la Universidad Autónoma del Estado de México por la Beca “Lic. Adolfo López Mateos” otorgada en el proyecto de investigación “Clonación de plantas de agave mezcalero (*Agave angustifolia*), vía organogénesis y embriogénesis somática en biorreactores de inmersión temporal” con número de registro: 4729/2019/CIB.

Financiamiento. Esta investigación es parte del proyecto “Clonación de plantas de *Agave angustifolia*, vía organogénesis y embriogénesis somática” con número de registro: 4729/2019/CIS, financiando por la Universidad Autónoma del Estado de México.

Conflicto de interés. Los autores declaran que no existen conflicto de intereses asociados con los resultados de esta publicación.

Cumplimiento de normas éticas. Los autores declaran que esta investigación fue supervisada por el Comité Interno de Bioética de la Universidad Autónoma del Estado de México, bajo la autorización del proyecto 4729 / 2019CIS.

Disponibilidad de datos. Los datos están disponibles con el Dr. Amaury-M. Arzate-Fernández (autor para correspondencia: amaury1963@yahoo.com.mx), con previa solicitud.

REFERENCIAS

Arzate-Fernández, A. M., Mejía-Franco, R. 2011. Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. Revista Fitotecnia Mexicana. 34 (2):101–106. URL:

<http://www.redalyc.org/html/610/61018842004/>

Arzate-Fernández, A. M., Piña-Escutia, J. L., Norman-Mondragón, T. H., Reyes-Díaz, J. I., Guevara-Suárez, K. L., 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. URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61049142004>

Aureoles-Rodríguez, F., Rodríguez-de la O, J. L., Legoria-Solano, J. P., Sahagún-Castellanos, J., Peña-Ortega, M. G. 2008. In vitro propagation of "Maguey Bruto" (*Agave inaequidens* Kocho), an endangered species with economical interest. Revista Chapingo Serie Horticultura. 14:263-269. URL: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rcsh/v14n3/v14n3a6.pdf>

Consejo Regulador del Mezcal. 2018. Informe estadístico 2018. URL: http://www.crm.org.mx/PDF/INF_ACTIVIDAD_ADES/INFORME2018.pdf. Fecha de consulta: 19 de septiembre de 2019.

Copeland, L., McDonald, M. 1995. Principles of Seed Science and Technology. Chapman & Hall. New York. 3^a edition pp.400-409.

Das, D., Reddy, M., Upadhyaya, K., Sopory, S. K. 2002. An efficient leaf-dise culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). Plant Cell Reports. 20: 999-1005. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0441-4>

Das, T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 31:253–255. DOI:10.1007/BF00036233.

Demeter, Z., Suranyi, G., Attila, M. V., Sramko, G., Beyer, D., Kónya, Z., Vasas, G., Hamvas, M. M., Máth, C. 2010. Somatic embryogenesis and regeneration from shoot primordia of *Crocus heuffelianus*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 100:349–353. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9645-4>

Domínguez-Rosales, M. S., González-Jiménez, M. L., Rosales-Gómez, C., Quiñones-Valles, C., Díaz-León, S. D., Mireles-Ordaz, S. J., Molphe-Balch, E. P. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del

- género *Agave*. Investigación y Ciencia, 41:53-62. URL: <https://www.redalyc.org/pdf/674/67404109.pdf>. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2019.
- Encalada-Aldaz, B. E. 2014. Evaluación del efecto de ácido giberélico con agua de coco y caseína hidrolizada como fuentes de nitrógeno en la maduración de embriones de palma coco cumbé (*parajubaea cocides* Burret) obtenidos a partir de callos, mediante establecimiento de suspensiones celulares. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. URL: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/8797/1/AC-B-ESPE-048110.pdf>
- Enríquez del Valle, J. R., Estrada, S. A., Rodríguez, O. G., Velasco, V. V. A., Campos, A. G. V. 2013. Sustrato y dosis de fertirriego en la aclimatización de vitroplantas de *Agave americana* var. *Oaxacencis*. Rev. fca UNCUYO. 45(2):341-348. URL: https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/6128/t45-2-nc03-enriquezdelvalle.pdf
- Fehér, A., Pasternak, T. P., Dudits, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 74:201–228. URL: <https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1024033216561>
- Freire-Seijo, M. 2003. Aspectos básicos de la embriogénesis somática. Biotecnología Vegetal. Vol. 3, No. 4: 195-209. URL: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/viewFile/263/237>.
- García-Mendoza, A. 2007. Los Agaves de México. Ciencias (87): 14-23.23. URL: <https://www.redalyc.org/pdf/644/64408704.pdf>. Fecha de consulta: 10 de octubre de 2019.
- García-Mendoza, A. 2011. Agavaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 88:1-95. URL: http://www.ibiologia.unam.mx/barra/publicaciones/floras_tehuacan/2012/F88_Agav.pdf
- George, E. F. 1993. Plant propagation by tissue culture. 2nd ed., London, Exegetics Ltd. Edington, wilts, England, pp. 89-91.
- Groenewald, E. G., Wessels, D.C. J., Koeleman, A. 1977. Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (Agavaceae). Zeitschrift für Pflanzenphysiologie Bd. 81:369-373. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(77\)80105-0](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(77)80105-0)
- Haccius, B. 1977. Question of unicellular origin of nonzygotic embryos in callus cultures. Phytomorphology. 28: 74-81. URL: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302076787>
- Ivanova, A., Velcheva, M., Denchev, P., Atanassov, A., Van Onckelen, A. 1994. Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. Physiologia Plantarum. 92: 85-89. URL: [10.1034/j.1399-3054.1994.920112.x](https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1994.920112.x)
- Jordan, M., Casaretto, J. 2006. Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. Eds. Squeo, F.A., y Cardemil, L. Fisiología. Vegetal. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile (2006). 15: xx-xx. URL: http://www.biouls.cl/librofv/web/pdf_word/Capitulo%2015.pdf. Fecha de consulta: 19 de septiembre de 2019.
- Karnachuk, R. A., Gvozdeva, E. S. 1998. The effects of light on hormonal balance and morphogenesis in wheat embryo-derived cultured tissues. Russian Journal of Plant Physiology. 45 (2): 245-251. URL: https://www.researchgate.net/publication/288593326_The_effects_of_light_on_hormonal_balance_and_morphogenesis_in_wheat_embryo-derived_cultured_tissues
- Kintzios, S., Drossopoulos, J., Shortsianitis, E., Peppes, D. 2000. Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.): Effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. Scientia Horticulturae. 85:137–144. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0304-4238\(99\)00135-1](https://doi.org/10.1016/s0304-4238(99)00135-1).
- Li, R., Bruneau, A. H., Qu, R. 2006. Improved plant regeneration and *in vitro* somatic embryogenesis of *Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze]. Plant Breeding. 125:52–56. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2006.01193.x>.
- Litz Richard, E. Jarret, R. L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. In: Roca, William M.; Mroginski, Luis A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical

- (CIAT), Cali, CO. p. 143-172. URL: http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Cultivo%20de%20Tejidos%20en%20la%20Agricultura/capitulo7_parte1.pdf
- Martínez-Palacios, A., Ortega-Larrocea, P. M., Chávez, V., Bye, R. 2003. Somatic embryogenesis and organogenesis of *Agave victoria-reginae*: Considerations for its conservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 74:135–142. URL: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1023933123131>.
- Medero, R. V., Borroto, N. C., Rodríguez, M. S., Gómez, K. R., López, T. J., García, G. M., J de la C V., Espinosa, L del S., Manuel, C. J., Martínez, M., Marlenys, T., Yadenys, T., Alvarez, M., García, J. 2000. Embriogénesis somática a partir de meristemos axilares en yuca. *Biotecnología Vegetal*. 1: 21-26.
- Méndez-Gallegos, S. J., Rössel, D., Amante-Orozco, A., Talavera-Magaña, D., García-Herrera, J., Velez-Jiménez, A. 2011. Biocombustibles a base de nopal y maguey. *Revista Salud Pública y Nutrición. Edición Especial No 5*. 83-93.
- Monja-Mio, K. M., Robert, M. L. 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 49:541–549. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>
- Monsalve-González, L. S., García-Rojas, C. Y., Sigarrosa-Rieche, A. K. 2005. Obtención de embriones somáticos primarios de *Theobroma cacao* en clones de interés regional para el departamento Norte de Santander, Colombia. *Revista Respuestas*. 1: 21-28.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15:473–497. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Nikam, T. D., Bansude, G. M., Aneesh Kumar, K. C. 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). *Plant Cell Rep*. 22:188–194. DOI:10.1007/s00299-003-0675-9.
- Nogales, L. 2017. Tepeztate, el maguey del monte. URL: <https://mezecologia.mx/tepeztate/>. Fecha de consulta: 19 de septiembre de 2019.
- Papanastasiou, I., Soukouli, K., Moschopoulou, G., Kahia, J., Kintzios, S. 2008. Effect of liquid pulses with 6-benzyladenine on the induction of somatic embryogenesis from coffee (*Coffea arabica* L.) callus cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 92:215–225. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9326-0>.
- Phillips, G. C., Collins, G. B. 1979. In vitro tissues culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Science*, 19:59-64. DOI: <https://doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183x001900010014x>.
- 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*. 43:569–575. DOI: 10.1007/s11627-007-9046-5
- Ramales, O. C., Ortiz, B. G. 2009. El proceso de elaboración del mezcal y la importancia económica de la industria. *Universidad Tecnológica de la Mixteca*. URL: <http://www.eumed.net/cursecon/ecolat/mx/2006/mcro-mezcal2.htm> Fecha de consulta: 19 de septiembre de 2019.
- Robert, M. L., Herrera, J. L., Contreras, F., Score, N. K. 1987. In vitro propagation of *Agave fourcroydes* Lem (Henequén). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 8:37– 48. DOI: 10.1007/bf00040731.
- Salazar, E., González, P., Hernández, C. 2009. Multiplicación *in vitro* de *agave cocui* trelease a través de yemas axilares. *Agronomía Tropical*. 59:129-135. URL: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2009000200002
- Santos-Carneiro, F., Domingos-Queiroz, S. R. O., Rodrigues-Passos, A., Nascimento, M. N., Santos, K. S. 2014. Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 44 (3):294-303. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1983-40632014000300005>.
- Sass, E. J. 1958. *Botanical Microtechniques*. 3rd ed. Iowa State University Press. USA. 277 p.
- Sidky, R. A., Zaid, Z. E. 2011. Direct production of somatic embryos and plant regeneration using TDZ and CPPU of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *International Journal of Academic Research*. 3: 792-796.
- Street, H., Withers, L. 1974. The anatomy of embryogenesis in culture. *Tissue Culture and*

- Plant Science. 179-187. Academic Press, London. New York.
- Tejavathi, D. H., Rajanna, M. D., Sowmya, R., Gayathamma, K. 2007. Induction of somatic embryos from cultures of *Agave vera-cruz* mill. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology—Plant*. 43:423–428. DOI:10.1007/s11627-007-9088-8.
- Thomas, T. H., Hare, P. D., van Staden, J. 1997. Phytochrome and cytokinin responses. *Plant Growth Regulation*. 23: 105-122. URL: [http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/07_Th](http://priede.bf.lu.lv/grozs/AuguFiziologijas/Augu_audu_kulturas_MAG/literatura/07_Thomas%20et%20al%201997%20light%20and%20cytokinin.pdf)
- omas%20et%20al%201997%20light%20and%20cytokinin.pdf
- Williams, E., Maheswaran, G. 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cell as an embryogenic group. *Annals of Botany*. 57: 443-462.
- Zaffari, G. R., Peres, L. E. P., Kerbauy, G. B. 1998. Endogenous levels of cytokinins, indolacetic acid, abscisic acid, and pigments in variegated somaclones of micropropagated banana leaves. *Journal of Plant Growth Regulation*. 17:59–61. DOI: <https://doi.org/10.1007/pl00007017>.