

La información compendiada en éste libro digital proviene de trabajos presentados durante el marco del 4to Congreso Internacional de Biología, Química y Agronomía de la Universidad Autónoma de Guadalajara celebrado del 25 al 27 de septiembre de 2013. La información fue presentada por investigadores y grupos de trabajo especializados sobre quienes recae la responsabilidad de la validez. Los autores, comité editorial y la casa editorial no somos responsables de las consecuencias del uso que se de a la información presentada. Los contenidos no necesariamente reflejan las políticas o puntos de vista de la Universidad Autónoma de Guadalajara ni la mención de productos comerciales o servicios implican compromisos o afiliaciones por parte de ésta.

Se autoriza el uso y distribución de los contenidos, libremente proporcionados por los autores para su compilación y registro ante ISBN, para lo cuál se requiere sean citados dando créditos a sus creadores. Cualquier duda o aclaración deberán ser realizadas directamente con los autores correspondientes cuyos datos de contacto están registrados en cada contribución.

Documento de Internet

ISBN: 978-607-719-003-5

EDITORIAL: Universidad Autónoma de Guadalajara, A.C. Av. Patria 1201. Lomas del Valle, Zapopan Jalisco.

## **Eficiencia en la micropropagación de dos especies silvestres del género *Polianthes* en relación a *Polianthes tuberosa***

**Adanelly de la Cruz Cruz<sup>1,\*</sup>, José Manuel Rodríguez Domínguez<sup>1</sup>, Ana Lilia Viguera Guzmán<sup>2</sup>, Liberato Portillo Martínez<sup>2</sup>, José Armando Arias García<sup>2</sup> Rafael Soltero Quintana<sup>2</sup>, Ma. Claudia Castañeda Saucedo<sup>3</sup>, Ernesto Tapia Campos<sup>1,+</sup>**

<sup>1</sup> Unidad de Biotecnología Vegetal, CIATEJ A.C./ Avenida Normalistas No. 800, Colonia Colinas de la Normal. C.P. 44270, Guadalajara, Jalisco, México.

<sup>2</sup> Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) Camino Ramón Padilla Sánchez No. 2100, Colonia Nextipac. C.P. 45220, Zapopan Jalisco, México.

<sup>3</sup> Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara (CUSUR-UDG) Av. Enrique Arreola Silva No 883, Colonia Centro, C.P.49000, Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

\* Autor que presentará trabajo.

+ Autor a quien la correspondencia deba ser enviada Tel.: (52)-(33)-33455200 ext. 1706; Fax: (52)-(33)-33455200 ext.1001. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Av. Normalistas 800, Guadalajara, Jalisco C.P. 44270, México. [etapia@ciatej.net.mx](mailto:etapia@ciatej.net.mx).

*Área del conocimiento: Biología de recursos naturales*

---

**Resumen:** El género *Polianthes* nativo de México, está representado por un grupo de especies con un alto potencial ornamental, de distribución restringida, sensible a perturbaciones de su hábitat natural y vulnerable a extinción. Algunas especies como *P. platyphylla* y *P. howardii* se encuentran amenazadas, es necesaria su conservación. Con la finalidad de establecer un protocolo para su propagación *in vitro*, se realizó la desinfección de bulbos con un fungicida-bactericida a base de Captan (1 mg·L<sup>-1</sup>) y Bactrol (1 mg·L<sup>-1</sup>) durante 20 min y cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) al 1% durante 10 min. Los bulbos se colocaron en medio de cultivo MS, fueron evaluados nueve tratamientos con citocininas y auxinas en diferentes concentraciones, se evaluaron tres variables de respuesta (a 65 d del establecimiento): número de brote, tamaño de brote y número de hojas en un diseño factorial completamente al azar. El análisis de datos detectó diferencia estadística significativa ( $\alpha =$

0.5) entre los tratamientos. Los resultados indican que la variable número de hoja y tamaño de brote, *P. howardii* logró una mayor eficacia obteniendo hasta dos hojas y tamaño de brote de 7.53 mm, para número de brotes, *P. platyphylla* fué más eficiente utilizando el tratamiento con ANA (Ácido naftalenacético)  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , BA (Benciladenina)  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , KIN (Cinetina)  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Estos resultados demuestran la utilidad del cultivo de tejidos en la propagación de especies silvestres del genero *Polianthes* como una alternativa de conservación.

**Palabras Clave:** conservación; cultivo de tejidos; recursos genéticos; ornamental

**Abstract:** The genus *Polianthes* is native from Mexico, it is represented by a group of species with a high ornamental potential; the genus has a restricted distribution and is sensitive to natural disturbance of its habitat and vulnerable to extinction. Some species like *P. platyphylla* and *P. howardii* are endangered, and thus their conservation is necessary. In this sense bulbs from *P. howardii*, *P. platyphylla* and *P. tuberosa* were disinfected with Captan ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) Bactrol ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 20 min and mercuric chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) 1% for 10 min, in order to establish a protocol for its *in vitro* propagation, lateral shoots were generated in MS medium and evaluated nine treatments with cytokinins and auxins in different concentrations; three variables were evaluated (65 days after the establishment): number of shoots, shoot size and number of leaves. The experiment was evaluated in a completely randomized factorial design. Data analysis detected significant statistical difference among the treatments ( $\alpha = 0.5$ ). The results indicate that in the case of *P. howardii* greater efficiency was achieved in the variables number of leaf and shoot size obtaining up to two leaves from shoot and an average size of shoot of 7.53 mm; meanwhile *P. platyphylla* showed the higher number of shoots, using the treatment with ANA (naphthaleneacetic acid)  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ -1BA (Benzyladenine)  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ -1KIN (Kinetin)  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . These results demonstrate the usefulness of tissue culture as an alternative for the conservation of *Polianthes*.

**Keywords:** conservation; tissue culture; genetic resources; ornamental

## 1. Introducción

México tiene una gran diversidad biológica debido a su posición geográfica y sus diferentes climas [1]. A nivel mundial nuestro país es considerado entre las naciones con mayor riqueza biológica, Las especies endémicas comprenden el 56% del total de la flora mexicana [2]. El género *Polianthes* L. (*Asparagaceae*) es endémico de México, e incluye 15 especies, tres variedades y unos pocos cultivares. Las especies silvestres del género presentan coloraciones que van desde el blanco, amarillo, rojizo, rosado y anaranjado. Algunas de estas especies están catalogadas como en peligro de extinción, una de las principales razones de este estatus es la pérdida del hábitat natural de estas especies que ha ido desapareciendo por los cambios en el uso del suelo. En México, cinco especies de *Polianthes* (*P. densiflora*, *P. howardii*, *P. longiflora*, *P. palustris* y *P. platyphylla*) se encuentran incluidas en la categoría de protección especial en la Norma Oficial Mexicana [3]. *P. howardii* está en peligro de extinción y *P. platyphylla* se encuentra amenazada. Por esta situación es necesario generar estrategias que ayuden a la conservación y mantenimiento de estas especies ya sea en su hábitat *in situ* o fuera de éste en colecciones de trabajo o bancos de germoplasma *ex situ*. Las especies silvestres de *Polianthes* se consideran perennes, el mayor crecimiento vegetativo se presenta durante primavera-verano, florecen durante verano-otoño y permanecen latentes en invierno. La propagación de esta especie puede ser vegetativa mediante el uso de los bulbos que están latentes en el suelo o generativa mediante el uso de las semillas, la desventaja principal de la propagación por semilla es el tiempo requerido para obtener plantas adultas ya que es muy largo (por lo tanto la propagación vegetativa de los bulbos es el método más económico de propagación, utilizándose la propagación por semilla solamente para programas de mejoramiento) sin embargo, esta puede ser una gran alternativa en el caso de mantener la diversidad genética y reproducir aquellas especies silvestres del género *Polianthes* que se encuentran en peligro de extinción.

El uso de herramientas biotecnológicas en plantas, en este caso el cultivo *in vitro*, puede ayudar a solucionar los problemas de propagación y conservación de especies vegetales amenazadas. El cultivo de tejidos vegetales puede utilizarse para diversos propósitos tales como: la micropropagación, la obtención de plantas libres de virus y otros patógenos, el mejoramiento genético y la conservación de germoplasma. La micropropagación presenta importantes ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación, entre ellas se pueden citar: Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo, reducción del tiempo de multiplicación, multiplicación de grandes cantidades de plantas en una superficie reducida a bajos costos y en un tiempo económicamente costeable, mayor control sanitario del material que se propaga, posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual existen pocos individuos, etc. [4].

La proliferación de yemas es el método más fácil y rentable de la micropropagación. Generalmente se elige este método porque tiene como ventajas principales ser aplicable a un amplio rango de especies

vegetales, proporciona uniformidad de producción y altas tasas de propagación, además de permitir el control de aparición de virus por utilizar partes meristemáticas del tejido como explante inicial [5].

En el caso del género *Polianthes* la información el uso del cultivo de tejidos se remite a una sola especie *P. tuberosa* la cual es la más importante del género por su uso ornamental [6]; sin embargo, dada la vulnerabilidad de las especies silvestres y la falta de información respecto a estrategias de conservación de las mismas se hace necesario conocer su comportamiento en condiciones *in vitro* como una alternativa a para mantener estos recursos genéticos.

## 2. Materiales y métodos

### *Material vegetal*

Como material inicial se utilizaron bulbos de plantas donantes de *P. tuberosa* variedad doble, provenientes de plantaciones comerciales del Estado de Morelos y bulbos de dos especies silvestres de *P. howardii* y *P. platyphylla* colectados en los Estados de Colima y Jalisco respectivamente.

### *Desinfección y establecimiento in vitro*

Se realizó el lavado de los explantes con agua corriente, se retiró la tierra en su totalidad y las capas superficiales en el caso de *P. howardii*, para *P. platyphylla* se retiraron las brácteas externas conservando las que se encontraban fusionadas y para *P. tuberosa* sólo se retiró la tierra, se limpiaron los explantes exhaustiva y cuidadosamente con ayuda de bisturí para evitar el manejo externo en campana de flujo laminar, en seguida estos explantes fueron lavados con jabón líquido comercial durante 10 min, se aplicó un tratamiento fungicida-bactericida, con una solución a base de Captan® (1 mg·L<sup>-1</sup>) y Bactrol® (1 mg·L<sup>-1</sup>), los explantes se colocaron en recipientes por separado, dentro de la solución durante 20 min bajo agitación constante. En seguida se pesó 1g de HgCl<sub>2</sub> (Cloruro de mercurio) y se colocó en 100 mL de agua destilada estéril. Se realizó la preparación de juegos de desinfección consistente en colocar 50 mL de agua destilada en frascos de vidrio, esterilizándose en autoclave durante 15 min. Posteriormente se agregaron 50 mL de HgCl<sub>2</sub> (Cloruro de mercurio) al 1% en campana de flujo laminar. Cada explante se colocó en un frasco que contenía 50% de agua destilada estéril y 50% de HgCl<sub>2</sub> al 1%, durante 10 min y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril, por último se colocó cada explante con ayuda de una pinza (esterilizada y flameada) en medio de cultivo MS [7], adicionado con 2 mg·L<sup>-1</sup> de ANA, 2 mg·L<sup>-1</sup> de BA y 0.5 mg·L<sup>-1</sup> de KIN [8], el pH fue ajustado a 5.8 ± 0.1, los frascos se sellaron, rotularon y colocaron en área de incubación a temperatura de 26°C ± 1°C bajo luz fluorescente (16 μmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>), con un fotoperiodo de 16:8 h luz:oscuridad.

### *Multiplicación*

Para inducir la formación de yemas y promover el desarrollo de yemas axilares, se utilizaron brotes formados en cada explante durante la etapa de establecimiento, en cada frasco se colocaron grupos de

tres brotes y se subcultivaron en frascos con medio de cultivo basal MS [7] al cual se adicionaron 30 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa, se evaluaron diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento las cuales se presentan en el cuadro 1, de tal manera que se tuvieron nueve tratamientos más un testigo sin reguladores.

**Cuadro 1.** Combinación de reguladores de crecimiento para producción de brotes

Tratamiento	ANA (mg·L <sup>-1</sup> )	BA (mg·L <sup>-1</sup> )	KIN (mg·L <sup>-1</sup> )
T0	0	0	0
T1	0.25	1.0	0.5
T2	0.25	2.0	0.5
T3	0.25	3.0	0.5
T4	0.50	1.0	0.5
T5	0.50	2.0	0.5
T6	0.50	3.0	0.5
T7	1.00	1.0	0.5
T8	1.00	2.0	0.5
T9	1.00	3.0	0.5

Los frascos se colocaron en un área de incubación a temperatura de 26°C ± 1°C bajo luz fluorescente (16 μmol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>), con un fotoperiodo de 16:8 h luz: oscuridad. Las variables evaluadas fueron: Número de brotes (NB), tamaño de brote (TH) y número de hojas (NH). Estas variables fueron evaluadas a 65 d de establecido el experimento, se utilizó un vernier para el caso de las variable tamaño del brote TB.

### *Análisis estadístico*

Se utilizó un diseño completamente al azar. La unidad experimental consistió en un frasco de cultivo con 1 explante y cada tratamiento constó de cuatro repeticiones (Cuatro frascos). Los datos fueron evaluados utilizando el paquete computacional SAS V8 [9] y la comparación de medias de Tukey  $\alpha = 0.5$ .

### **3. Resultados**

En el presente estudio se encontró que el desinfectante más eficaz para los bulbos de *Polianthes* previamente tratados en solución fungicida-bactericida, fue 50% de agua destilada estéril y 50% de HgCl<sub>2</sub> al 1%, durante 10 min, realizándose tres enjuagues con agua destilada estéril, por lo tanto, esta combinación de desinfección fue la que se aplicó a todo el experimento.

El medio de cultivo MS, junto con la combinación de reguladores de crecimiento utilizada por [8], fue eficiente para la multiplicación de los bulbos de las diferentes especies. En cuanto a las variables evaluadas, los resultados para número de brotes, el promedio por variedad fue diferente. *P. platyphylla* fue la especie que presentó el mayor número de brotes promedio por explante, seguido de los explantes de la especie *P. howardii* y *P. tuberosa*, aunque estos últimos no fueron diferentes estadísticamente (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Número de brotes en las diferentes especies a 65 d del establecimiento *in vitro*.

Especie de <i>Polianthes</i>	Número promedio de brotes	Grupo
<i>P. platyphylla</i>	3.00	A
<i>P. howardii</i>	1.52	B
<i>P. tuberosa</i> var. Doble	0.95	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Para la variable tamaño de brote los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento que contenía una mayor concentración de citocininas, obteniendo brotes con un tamaño de hasta 12 mm. En cuanto a la especie, la que mostró mejor respuesta fue *P. howardii* alcanzando un tamaño promedio de brote de hasta 7.53 mm.

**Cuadro 3.** Tamaño promedio de brote por tratamiento a 65 d del cultivo *in vitro*.

Tratamientos en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	Tamaño promedio de brote (mm)	Grupo
ANA 1.0, BA 3.0, KIN 0.5	12.06	A
Testigo	10.47	B A
ANA 0.25, BA 3.0, KIN	7.47	B A C
ANA 1.0, BA 1.0, KIN	6.60	B A C
ANA 0.25, BA 1.0, KIN 0.5	6.54	B A C
ANA 0.5, BA 2.0, KIN 0.5	4.41	B C
ANA 1.0, BA 2.0, KIN 0.5	3.82	C
ANA 0.25, BA 2.0, KIN 0.5	3.80	C
ANA 0.5, BA 3.0, KIN 0.5	3.14	C
ANA 0.5, BA 1.0, KIN 0.5	2.16	C

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Por último en la variable número de hojas los resultados estadísticos muestran que *P. tuberosa* var. Doble, fue menos eficiente mientras que *P. howardii* y *P. platyphylla* se comportaron de una manera similar, siendo más eficientes con respecto a esta variable. Los resultados de este experimento indican que los tratamientos probados incrementaron el número de hojas con el tratamiento que contenía la

mayor concentración de reguladores de crecimiento ANA 1.0, BA 3.0, KIN 0.5 mg·L<sup>-1</sup> propiciando la formación de un promedio de tres hojas por explante.

**Cuadro 5.** Número promedio de hojas en especies de *Polianthes* a 65 d del cultivo *in vitro*.

Especie	Número promedio de hojas	Grupo
<i>P. howardii</i>	2.31	A
<i>P. platyphylla</i>	2.23	A
<i>P. tuberosa</i> var. Doble	1.08	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes, tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 4. Discusión

La contaminación microbiana es un problema constante que compromete el desarrollo de todas las técnicas *in vitro*. La descontaminación de los explantes obtenidos de las partes subterráneas ha sido una tarea muy difícil, reportado por varios investigadores [10]. Las especies bulbosas presentan en el interior de sus bulbos mucilago y bacterias que dificultan el establecimiento de un cultivo *in vitro* en condiciones asépticas, como lo mencionan algunos autores [11], quienes reportaron este tipo de problemas para hacer una propagación eficiente en *Zantedeschia albomaculata*. [12], mencionó que durante el establecimiento *in vitro* de yemas del cormo de nardo (*Polianthes tuberosa* L.), hongos y bacterias causan la muerte del explante, reportando como agentes causales de la contaminación a *Fusarium* sp. y *Rhizopus* sp.; concluyen que es posible que estos hongos estén localizados dentro de las yemas del cormo del bulbo de nardo, lo que dificulta la acción de los desinfectantes superficiales. [13], propusieron el uso de HgCl<sub>2</sub> con una concentración al 0.1% durante 2 a 3 min, para esterilizar bulbos de *P. tuberosa*. [14], también reportan el uso de HgCl<sub>2</sub> 0.1% para esterilizar superficialmente escamas y yemas axilares de dos cultivares de *P. tuberosa*, seguido de una inmersión en hipoclorito de sodio (NaClO). Por otra parte la formación de brotes múltiples es la fase más crucial en la propagación a gran escala de plantas por medio del cultivo de tejidos. La inducción, crecimiento, desarrollo y proliferación de brotes axilares son, por lo general procesos promovidos por la incorporación de reguladores de crecimiento al medio de cultivo; comúnmente las citocininas suprimen la dominancia del meristemo apical y promueven la formación de brotes axilares [15].

Se ha mencionado [16], que una proporción auxina-citocinina balanceada mantiene las células en un estado indiferenciado, mientras que una proporción alta de citocinina en relación auxina promueve el desarrollo de brotes y una proporción baja promueve el desarrollo de raíces. [14], al usar dos diferentes fuentes de explante (escamas y yemas axilares) para la propagación de dos cultivares de *P. tuberosa*, reportan que el mejor explante con base a la producción de brotes, fueron las escamas, al usar el medio basal MS, suplementado con 4 mg·L<sup>-1</sup> de BA y 0.2 mg·L<sup>-1</sup> de IAA.

La respuesta para la variable tamaño de brote concuerda con la obtenida por [17], quienes propagaron *Agave inaequidens* Koch, e indican que los tratamientos que tenían concentraciones de  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA, incrementaron el tamaño de la planta.

Por otra parte las especies silvestres *P. howardii* y *P. platyphylla* se comportaron de una manera similar, siendo más eficientes con respecto a la variable número de hojas, sin embargo de manera natural *Polianthes tuberosa* es una especie que presenta gran vigor y alta eficiencia, este cultivar tiene entre 6 y 10 hojas por roseta, mientras que *P. howardii* y *P. platyphylla* tienen entre 2 y 6 hojas por roseta en estado silvestre, sin embargo en estado *in vitro* estos últimos mostraron mayor eficiencia para la variable en cuestión, esto quizá se deba al contenido endógeno de hormonas vegetales y al ser adicionados reguladores de crecimiento al medio de cultivo tiene efectos sinérgicos, los cuales pueden variar en la respuesta de la planta o parte de esta, en la que también están involucrados otros factores como la edad, condiciones ambientales, estado fisiológico de desarrollo y su estado de nutrición [18]. Cabe mencionar que esta respuesta se obtuvo con la mayor utilización de citocininas, [17] obtuvieron resultados similares utilizando una concentración de  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA, para incrementar el tamaño de la planta y el número de hojas de *Agave inaequidens* Koch. [19], mencionó que las citocininas generan cambios morfológicos en los tejidos cultivados *in vitro*, resultado del estímulo de la actividad mitótica celular, lo que genera brotación, esto podría explicar los resultados obtenidos tomando en cuenta que en este tratamiento se utilizó en mayor concentración este regulador de crecimiento.

## 5. Conclusiones

Este trabajo demostró que es posible propagar a las especies silvestres del género *Polianthes* (*P. howardii* y *P. platyphylla*), las cuales responden eficientemente en condiciones *in vitro* en relación a *P. tuberosa* var. Doble., para las que no existían antecedentes en este sentido. La respuesta a las condiciones *in vitro* fue diferente entre especies de tal forma que en el caso de la variable número de brotes por explante, la mejor respuesta la presentó *P. platyphylla*, mientras que *P. tuberosa* fue la menos eficiente en cuanto a esta variable. Respecto a la variable tamaño de brote y número de hojas, se observó la misma respuesta dependiente de la especie en este caso *P. howardii* presentó la mejor respuesta en cuanto a la variable tamaño de brote y al igual que *P. platyphylla* mostró mayor eficiencia para la variable número de hojas, por el contrario *P. tuberosa* no fue eficiente para ninguna de las variables evaluadas. El mejor tratamiento para la propagación *in vitro* de las especies del género *Polianthes* que fueron utilizadas en esta investigación, fue  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANA,  $3.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BA y  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de KIN para todas las variables, el cual contenía una mayor concentración de citocininas.

## Agradecimientos

Se agradece a FOMIX Morelos (MOR-2009-C02-120064) por el financiamiento para el desarrollo de esta investigación.

## Referencias

- [1] Ramamoorthy TP, Bye R, Lot A y Fa J. 1998. *Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución*. Ed. Instituto de Biología, UNAM. 812 p.
- [2] Villaseñor JL. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. *Interciencia*. 28(3): 160-166.
- [3] Anónimo. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001. Protección ambiental Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, Segunda Sección. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, D.F. pp. 1-65.
- [4] Abdelnour-Esquivel A y Vincent-Escalant J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE. Turrialba, Costa Rica pp. 2-3.
- [5] Torres MI, Morales MM, Santacruz RF y Rodríguez A. 2006. *Micropropagación por organogénesis in vitro de Agave tequilana Weber variedad azul*. Universidad de Guadalajara CUCBA. pp. 8-9.
- [6] R. Barba-Gonzalez, J.M. Rodriguez-Dominguez, M.C. Castañeda-Saucedo, A. Rodriguez, J.M. Van Tuyl, E. Tapia-Campos\* .2012. MEXICAN GEOPHYTES I. THE GENUS POLIANTHES. *Floriculture and Ornamental Biotechnology* 6(1): 122-128.
- [7] Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiological Plantarum* 15: 473-497.
- [8] Muralidhar CE y Mehta AR. 1982. Clonal propagation of three ornamental plants through tissue culture methods. In *Plant Tissue Culture 1982. Proceedings 5th International Congress of plant Tissue Cell Culture*. A. Fujiwara, (ed.). pp. 693-694.
- [9] Copyright (c) 1999 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. All rights reserved.
- [10] Seabrook JFA. 1990. *Narcissus* (Dffodils). In: Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R. y Bajaj, V.P.S. (eds). *Handbook of plant cell culture Vol. V: Ornamental species*. McGraw-Hill Publishing Company. New York. pp. 577-597.
- [11] Chang HS, Chakrabarty D, Hahn EJ y Paek KY. 2003. Micropropagation of calla lily (*zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*. 39: 129-134.
- [12] Martínez MO. 2009. Control químico *in vitro* de hongos contaminantes de cultivos de nardo (*Polianthes tuberosa L.*). Tesis de ingeniería. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 27.
- [13] Shagufta N, Farah A, Saiqa L, kiran S y Amina T. 2012. *In vitro* propagation of tuberose

(*Polianthes tuberosa*). *Journal of Medicinal Plants Research*. 6: 4107-4112.

- [14] Jyothi R, Singh AK y Krishan PS. 2008. Tuberose cultivars propagation. ICAR a science and technology newsletter. 14 (2): 1-2.
- [15] Shimizu SS y Mory H. 2001. Control of outgrowth and dormancy in axilar buds. *Plant Physiology*. 127: 1403-1413.
- [16] George E. 1996. *Plant propagation by tissue culture. In practice. Part 2. Exegetics*, Easter Press, England. 786 p.
- [17] Aureoles RF, Rodríguez JL, Legaria JP, Sahagún CJ y Peña MG. 2008. Propagación *in vitro* del “Maguey Bruto” (*Agave inaequidens* Koch), una especie amenazada y de interés económico. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14(3): 263-269.
- [18] Rojas GM y Ramírez H. 1987. *Control hormonal del desarrollo de las plantas: Fisiología-Experimentación*. Limusa. México, D. F. 239 p.
- [19] Jankiewicz LS. 2003. *Reguladores de crecimiento, desarrollo y resistencia en plantas. Propiedades y acción*. Ed. Mundi- Prensa. México, D. F. 487 p.