

Propagación *in vitro* del laurel silvestre (*Litsea glaucescens* Kunth) y análisis de la diversidad genética de poblaciones del centro de México

In vitro propagation of wild laurel (*Litsea glaucescens* Kunth) and analysis of genetical diversity of central Mexican populations

Claudia Montserrat Valle Rodríguez,¹
Carlos Antonio Dávila Figueroa,¹ María de Lourdes de la Rosa Carrillo,¹
Eugenio Pérez Molphe-Balch,¹ José Francisco Morales Domínguez²

Valle Rodríguez, C.M.; Dávila Figueroa, C.A.; De la Rosa Carrillo, M.L.; Pérez Molphe-Balch, E.; Morales Domínguez, J.F., Propagación *in vitro* del laurel silvestre (*Litsea glaucescens* Kunth) y análisis de la diversidad genética de poblaciones del centro de México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 57, 19-26, 2013.

RESUMEN

El laurel silvestre (*Litsea glaucescens* Kunth) es una especie forestal considerada en peligro de extinción debido a la reducción de sus poblaciones en la colecta inmoderada e ilegal de sus ramas para diferentes usos. En el presente trabajo, se ubicaron y estudiaron algunas poblaciones de laurel silvestre en los estados de Aguascalientes y San Luis Potosí. Para el protocolo de propagación, el mejor tratamiento fue 0.5 mg L⁻¹ de BA en medio MS utilizando como explantes segmentos nodales a partir de brotes de semillas maduras germinadas *in vitro* y para el enraizamiento fue con 1 mg L⁻¹ de AIB. El dendrograma mostró una separación entre un grupo que incluyó sólo ejemplares de San Luis Potosí y otro que incluyó a otros ejemplares de esta región junto con los de Aguascalientes. Los ejemplares generados *in vitro* se mantuvieron dentro del agrupamiento que incluye la localidad donde se obtuvieron.

Palabras clave: Lauraceae, RAPD, árbol filogenético, OPA, PCR, análisis de similitud, distancias euclídeas.

Keywords: Lauraceae, RAPD, phylogenetic tree, OPA, PCR, analysis of similarity, Euclidean distances.

Recibido: 6 de Noviembre de 2012, aceptado: 23 de Enero de 2013

¹ Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes.

² Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, jfmoral@correo.uaa.mx.

ABSTRACT

The wild Laurel (*Litsea glaucescens* Kunth) is a forestry species considered an endangered species due to the reduction of their population by extensive and illegal collections of their branches for different uses. In this study several populations of wild Laurel in Central Mexico (Aguascalientes and San Luis Potosí States), were localized and studied. The most effective protocol for propagation was obtained from explants generated of the germination of *in vitro* mature seeds, with 0.5 mg L⁻¹ BA. For plant rooting the best treatment was that of 1 mg L⁻¹ AIB. The dendrogram showed a separation between a group that included only specimens from San Luis Potosí, and a second group with specimens from San Luis Potosí but also specimens from Aguascalientes. The specimens generated *in vitro* did not split from the rest and were kept inside the group from the location which they were initially from.

INTRODUCCIÓN

El género *Litsea* comprende cerca de 400 especies mayormente nativas de Asia. Generalmente son árboles perennes que miden entre 1 a 12 m de alto y habitan en bosques de encino y en cañadas o a la orilla de arroyos. Crece entre los 1,300 y 2,500 msnm y se distribuyen desde el norte de México hasta Costa Rica. En México,

el género está representado únicamente por el laurel silvestre (*Litsea glaucescens*) (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

Litsea glaucescens tiene múltiples usos, por lo que se considera como una de las especies forestales no maderables más importantes de México. Sus usos van desde medicinales, alimenticios y perfumes hasta rituales religiosos. En el estado de Aguascalientes su explotación se da principalmente antes del Domingo de Ramos, festividad religiosa que se celebra entre los meses de marzo y abril; esto repercute en la pérdida de la capacidad reproductiva de la población, ya que coincide con la época de floración de la planta (Dávila *et al.*, 2011). Por lo tanto, es una especie protegida y se ha catalogado como en peligro de extinción (NOM-059-SEMARNAT-2001).

Actualmente, el problema más grave del laurel es la poca eficiencia de los sistemas de propagación. La reproducción a través de semillas y la propagación vegetativa son incapaces de satisfacer la demanda de plantas que se requieren para emprender programas de recuperación y de uso racional de esta especie. En este sentido, la propagación masiva a través de métodos biotecnológicos, o micropropagación, es una alternativa para la solución de este problema. Sin embargo, a la fecha no existen reportes acerca del desarrollo de las metodologías requeridas para el cultivo y propagación *in vitro* del laurel, por lo que es necesario llevar a cabo la investigación necesaria para el establecimiento de estos protocolos.

Por otro lado, la variabilidad genética presente en las poblaciones de laurel es desconocida, por lo que resalta el interés en estudiar en este aspecto con la finalidad de tener más elementos para rescatar este recurso natural. En este contexto, las técnicas más utilizadas son los marcadores moleculares, dentro de los cuales se encuentra la técnica RAPD (polimorfismo en el ADN amplificados al azar) (Williams *et al.*, 1990), que determinan la variación genética en diferentes organismos y cultivares de plantas. Esta técnica es tan confiable que permite obtener resultados equivalentes a los de otras técnicas como AFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados) (Badenes *et al.*, 2003). Se han reportado varios estudios que analizan la diversidad genética utilizando RAPD en plantas de interés agrícola o forestal, tales como: *Agave spp.*

(Alfaro-Rojas *et al.*, 2007) y *Lupinus elegans* (Lara-Cabrera *et al.*, 2009) y en especies leñosas con *Pinus patula* (Luna Rodríguez *et al.*, 2005).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo para la propagación *in vitro* de plantas de laurel y el análisis de su diversidad genética de material colectado en campo y cultivado *in vitro*, empleando la técnica RAPD, en tres áreas de colecta: Sierra de Laurel, Sierra Fría y Estación Biológica "Agua Zarca" de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, en el estado de Aguascalientes, y Sierra de Álvarez, en San Luis Potosí.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de localidades de laurel y colecta de material biológico

Se visitaron locaciones de laurel silvestre en la Sierra Fría y la Estación Biológica "Agua Zarca" (EBAZ), perteneciente a la Universidad Autónoma de Aguascalientes (municipio de San José de Gracia, Aguascalientes), Sierra de Laurel (Calvillo, Aguascalientes), y Sierra de Álvarez (San Luis Potosí). Las localidades fueron ubicadas mediante un sistema de posicionamiento global (GPS; Garmin eTrex Legend GPS Navigator). Para los experimentos de propagación, se colectaron semillas maduras e inmaduras, muestras de brotes y yemas axilares de árboles de laurel, durante los meses de mayo-septiembre de 2009 y 2010. Las muestras fueron colocadas en hielera y almacenadas a 4°C. Para los análisis de RAPD, se realizó la colecta de hojas como se muestra en la tabla 2, las cuales fueron almacenadas a 4°C y, posteriormente, a -70° hasta su uso.

Desinfección del material vegetal y germinación de semillas

Todos los explantes fueron lavados y desinfectados mediante el siguiente proceso: primeramente tres lavados con agua corriente y jabón desinfectante Dermoclean por un tiempo de 15 min. cada uno, seguido de un lavado con etanol a 70% durante 1 min. y uno con agua corriente. Para la desinfección, las muestras se colocaron en una solución de blanqueador comercial (Cloralex) a 20% durante 25 min., seguido de tres lavados con agua destilada. Posteriormente, se adicionó 100 ml de una solución de PPM (Plant Preservative Mixture, Plant Cell Technology) a 1% durante 1 h, ulteriormente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril por un tiempo de 5

min, cada uno. Para el caso de las semillas antes de la desinfección, se les eliminó la testa. El material fue puesto en medios de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con 0.7% p/v de agar a pH 5.7 y se esterilizó en autoclave a 1.05 kg cm⁻² y 121°C, durante 15 min. Los explantes para su germinación o propagación se mantuvieron en la oscuridad durante 21 d, con recambios a medio cuando presentaban problemas de oxidación y después a fotoperiodos de 16/8 h bajo luz fluorescente (54 μmol m⁻² s⁻¹, lámparas luz diurna) a 25 ± 2 °C, hasta la obtención de plántulas (adaptaciones del protocolo de Bunn, 2005)

Desarrollo del sistema de propagación *in vitro*

Se tomaron yemas apicales y axilares provenientes de dos fuentes: 1) tallos tomados directamente de plantas del campo y desinfectadas de acuerdo a la metodología antes descrita, y 2) de plántulas axénicas obtenidas de la germinación de semillas *in vitro*; ambos explantes se inocularon en los siguientes tratamientos con el fin de inducir la brotación múltiple: a) 0.5 mg L⁻¹ de Benciladenina (BA); b) 1 mg L⁻¹ de BA, y c) 1 mg L⁻¹ de BA con 0.25 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético (ANA). Los explantes fueron colocados en forma vertical en frascos magenta con 60 ml de cada tratamiento durante 30 d y posteriormente se transfirieron a medio basal (MS sin reguladores del crecimiento) para permitir el desarrollo de los brotes con subcultivos cada 60 d. Los brotes bien diferenciados de 2-3 cm de longitud fueron pasados a medio MS con 1 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico (AIB) y 0.4% de carbón activado para inducir su enraizamiento (Mao *et al.*, 2000; Bunn, 2005).

Análisis tipo RAPD

Se extrajo ADN genómico a partir de 3 mg de hojas de laurel mediante el paquete comercial "Genomic DNA Purification Kit # 0512" (Fermentas). Se usaron primeramente los 20 iniciadores de la serie OPA1 (Operon Technologies Inc.) (tabla 1). En los análisis de PCR, se utilizó el paquete comercial PCR Master Mix (Fermentas). La mezcla de reacción fue: PCR Master Mix 12.5 μl; ADN 100 ng; Oligonucleótidos 50 ng y agua destilada para un volumen total de 25 μl. La amplificación fue bajo las condiciones de 94 °C (3 min), 94 °C (1 min.), 40 °C (1 min.), 72 °C (1 min.) por 45 ciclos y una extensión de 72 °C (5 min.) en el termociclador TECHNE TC 412. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa a 1.7% en buffer TAE 1.7X, durante 4 h

a 50 V (Luna Rodríguez *et al.*, 2005), y posteriormente teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta. Las imágenes fueron capturadas con el fotodocumentador de DigiDoc-It y procesadas con el programa Doc-ItLS Ver 5.5.3 de Ultra-Violet Products Ltd. (UVP). Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

Análisis de datos

Se integraron los resultados obtenidos de los 326 análisis RAPD. Para muestras de cada individuo, la presencia o ausencia de cada banda se marcó designando el número 1 a la banda presente y con el 0 a la banda ausente, con el fin de tener una matriz de ceros y unos que fue utilizada en el programa STATISTICA versión 7.0. La matriz de distancias genéticas se utilizó para producir un dendrograma por el método de Ward.

Tabla 1. Oligonucleótidos de la serie OPA, utilizados en los análisis tipo RAPD en laurel silvestre

Oligonucleótidos	Secuencia
OPA01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA03	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA04	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA05	5'-AGGGGTCTTG-3'
OPA06	5'-GGTCCCTGAC-3'
OPA07	5'-GAAACGGGTG-3'
OPA08	5'-GTGACGTAGG-3'
OPA09	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA10	5'-GTGATCGCAG-3'
OPA11	5'-CAATCGCCGT-3'
OPA12	5'-TCGGCGATAG-3'
OPA13	5'-CAGCACCCAC-3'
OPA14	5'-TCTGTGCTGG-3'
OPA15	5'-TTCCGAACCC-3'
OPA16	5'-AGCCAGCGAA-3'
OPA17	5'-GACCGCTTGT-3'
OPA18	5'-AGGTGACCGT-3'
OPA19	5'-CAAAGCTCGG-3'
OPA 20	5'-GTTGCGATCC-3'

RESULTADOS

Localización del material vegetal

Se encontraron locaciones de laurel silvestre en los estados de Aguascalientes y San Luis Potosí, México (tabla 2). En la Sierra Fría 90% de los ejemplares son arbustos con una altura entre 1 a 1.5 m (figura 1A). En la Sierra de Laurel también la mayoría son arbustos (90%) entre 1 a 2 m de alto, como pocos árboles con alturas de hasta 12 m (Figura 1B). En esta localidad se observaron

Tabla 2. Ubicación geográfica de las poblaciones de laurel silvestre donde se colectaron las muestras de tejido

Localidad	COORDENADAS	No. de muestras
Sierra Fría P1; Aguascalientes	22° 09' 277" N 102° 35' 154" O	8
Sierra Fría P2; Aguascalientes	22° 09' 154" N 102° 35' 106" O	8
Sierra Fría P3; Aguascalientes	22° 09' 015" N 102° 35' 106" O	4
Sierra de Laurel P1; Aguascalientes	22° 46' 947" N 102° 39' 255" O	6
Sierra de Laurel P2; Aguascalientes	21° 46' 158" N 102° 39' 081" O	8
Sierra de Laurel P3; Aguascalientes	21° 06' 466" N 102° 36' 741" O	6
Estación Biológica UAA; Aguascalientes	22° 05' 30" N 102° 34' 30" O	10
Sierra de Álvarez P1; San Luis Potosí	22° 09' 376" N 100° 37' 469" O	5
Sierra de Álvarez P2; San Luis Potosí	22° 09' 189" N 100° 37' 439" O	5
Sierra de Álvarez P3; San Luis Potosí	22° 09' 466" N 100° 36' 741" O	5

evidencias de saqueo (figura 1C). En lo que respecta a la Sierra de Álvarez, San Luis Potosí, los ejemplares tienen una altura promedio 3 m y una densidad poblacional mayor a los encontrados en Aguascalientes (figura 1D).

Desarrollo del sistema de propagación *in vitro*

Los primeros experimentos se llevaron a cabo utilizando tallos colectados directamente de plantas del campo, los cuales presentaron un alto índice de contaminación y/o necrosis por oxidación. Estos explantes, tratados con 0.5 mg/L⁻¹ de BA todos, se necrosaron de la base y murieron a los pocos días (figura 2A). Con 1 mg/L⁻¹ de BA los explantes desarrollaron tejido calloso en la base que eventualmente se oxidó y necrosó junto con la parte aérea (figura 2B). Con 0.25 mg L⁻¹ de ANA, se obtuvo una mayor producción de tejido



Figura 1. Aspectos de las poblaciones de laurel silvestre estudiadas. A) Ejemplares de porte arbustivo en Sierra Fría, Ags.; B) ejemplar de porte arbóreo en la Sierra de Laurel, Ags.; C) señales de colecta ilegal (flecha) en una planta de laurel silvestre en la Sierra de Laurel, Ags.; d) población de laurel silvestre en buen estado de conservación en la Estación Biológica "Agua Zarca" de la UAA.

calloso y, finalmente, una necrosis más rápida de los tejidos debido a problemas de oxidación. Sin embargo, se observó que cortos períodos de inducción en este medio de germinación (dos semanas) y con la adición de carbón activado se inhibía el desarrollo de tejido calloso, pero desafortunadamente los explantes terminaban necrosándose antes del subcultivo (figura 2C).

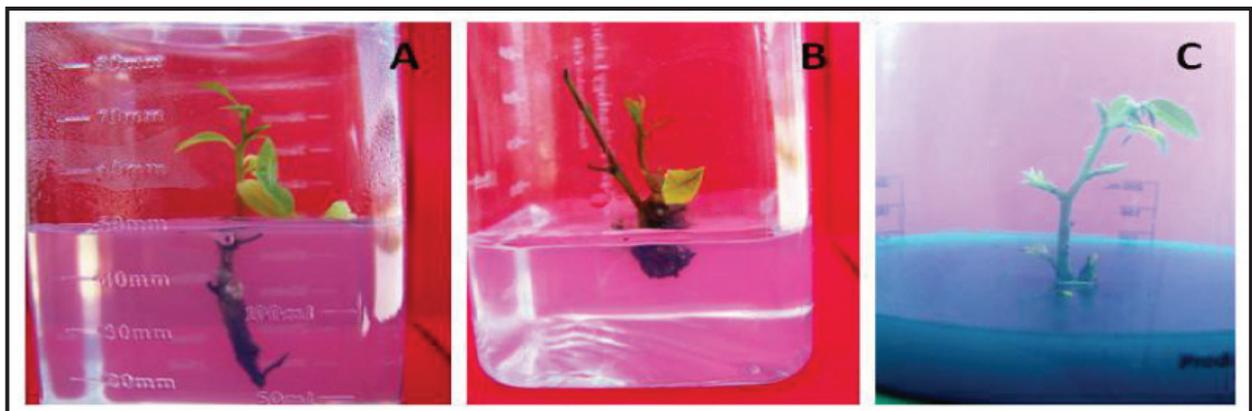


Figura 2. Propagación a partir de tallos colectados en campo: A) con 0.5 mg L⁻¹ de BA, en donde se aprecia la oxidación de la base del explante sumergida en el medio; B) con 1 mg L⁻¹ de BA, en donde se aprecia el desarrollo de tejido calloso en la base del explante; y C) con 1 mg L⁻¹ BA más 0.25 mg L⁻¹ de ANA adicionado con 0.4% de carbón activado.



Figura 3. Respuesta obtenida con los tratamientos para la germinación de meristemos preexistentes con explantes obtenidos de semillas germinadas *in vitro*: (A) con 0.5 mg/L de BA; (B) con 1 mg/L de BA; y (C) con 1 y 0.25 mg/L de BA y ANA, respectivamente.

Otra fuente de explantes fueron los tallos de plántulas germinadas *in vitro*, las cuales sí mostraron respuesta positiva ante los diferentes tratamientos evaluados (figura 3). Con 0.5 mg/L⁻¹ de BA desarrollaron pocos brotes, pero se elongaron rápidamente y generaron muchos entrenudos que fueron utilizados para los experimentos de propagación (figura 3A). Con 1 mg/L⁻¹ de BA se obtuvo una proliferación más abundante, pero con tejido calloso en la base de los explantes, mismo que eventualmente desarrolló embriones somáticos que posteriormente se necrosaron (figura 3B). La adición de ANA en el medio de cultivo favoreció la brotación de los meristemos preexistentes (figura 3C).

Para la producción de raíces, con 1 mg L⁻¹ de AIB los explantes desarrollaron raíces y una vez que eran transferidos a medio basal, éstas se desarrollaban rápidamente favoreciendo el crecimiento de la planta (figura 4).



Figura 4. Respuesta obtenida con los tratamientos para la enraizamiento, en donde se aprecia el vigor de la planta y el desarrollo de raíces.

Análisis de variabilidad genética

De los 20 oligonucleótidos decámeros de la serie OPA que se probaron, 5 fueron los que generaron mayor número de bandas; estos fueron: OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-13 y OPA-18. En la figura 5 se observan las diferentes bandas amplificadas con el OPA-03 para algunas muestras de laurel de la Sierra de Laurel.

El dendrograma (figura 6) mostró que todos los individuos de laurel que fueron sometidos a la prueba estaban relacionados, ya que se ubicaron por debajo de 5% de variación en un mismo grupo, alejando al control (papaya) ancla del dendrograma. Dentro de las muestras de laurel, se aprecian dos grandes grupos: 1) individuos provenientes de la Sierra de Álvarez, San Luis Potosí y 2) individuos provenientes de la Sierra de Laurel y de la Sierra Fría. Mientras que los individuos de material de laurel *in vitro* encajan perfectamente entre los laureles provenientes de Sierra del Laurel de donde fueron recolectados inicialmente.

DISCUSIÓN

En Aguascalientes existen localidades de laurel silvestre con densidad poblacional desde los 5 a 90 individuos, y con difícil acceso (muchas son propiedades privadas). Como se puede apreciar en la tabla 1, la recolecta de las muestras fue limitada debido a que existen ya pocos ejemplares de esta especie en su hábitat natural. En las localidades de San Luis Potosí, las plantas, en su mayoría, son arbustos entre 2 y 5 m de alto y de fácil acceso, sin embargo, no se observó saqueo como las zonas visitadas en Aguascalientes (figura 1C).

Para el sistema de propagación *in vitro*, en esta especie se encuentra con poca información, al parecer, sólo existe un trabajo de este

blemente a causa del estrés osmótico al que se vieron sometidos, además de que la evidencia de campo indica que ésta es una especie que requiere de medios enriquecidos en nutrientes. Estos resultados son contrarios a lo reportado por Gomes y Canhoto (2003), quienes usaron medios a 50% para inducir el enraizamiento de los brotes a partir de explantes apicales y de nodos de *Eucalyptus nitens* Maiden. La adición de AIB al medio basal indujo el enraizamiento en una alta proporción de los brotes, los cuales una vez que desarrollaban las raíces mostraban un crecimiento vigoroso (figura 4) con eficiencias similares a lo reportado por Gupta *et al.*, (1983), quienes trabajaron con segmentos nodales de *Eucalyptus torelliana*, pero inferior a los resultados obtenidos con otra especie del género *Litsea* (Mao *et al.*, 2000).

Al inicio de este estudio se tenía la hipótesis de que todas las zonas donde se encontró laurel silvestre en el estado de Aguascalientes albergaban diferentes poblaciones de la especie, ya que los individuos mostraban diferencias en sus hábitos de crecimiento y las localidades están alejadas unas de otras. Sin embargo, en los resultados de los análisis moleculares en el dendrograma (figura 6), se observa que los individuos de ambas serranías están en el mismo grupo, clasificados en dos subgrupos, lo cual indica una estrecha relación entre ellas, así mismo se agrupan a todos los individuos de Aguascalientes en niveles diferentes a los de San Luis Potosí, lo que hace la diferencia en su constitución genética al menos en cuanto a la adaptación de éstos a su hábitat, ya que las características de Sierra de Álvarez son muy parecidas a las serranías de Aguascalientes. También se puede observar que dentro

de los laureles de la Sierra Fría se encuentran los organismos colectados de la Estación Biológica de la UAA, esto resulta lógico ya que ésta se encuentra ubicada dentro de los límites de la Sierra Fría. En cuanto a los individuos producidos *in vitro*, se muestra una relación muy cercana con los individuos donde fueron recolectadas las semillas que originaron los cultivos, lo que indica que se puede planear la reforestación a futuro con éstos sin afectar, en gran medida, la composición genética de las poblaciones originales.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un protocolo para la propagación *in vitro* de laurel silvestre. Esto hace que éste sea viable para producir plantas con fines de reforestación y regeneración de poblaciones dañadas en esta especie. El análisis RAPD, detectó variabilidad genética entre las poblaciones de laurel originarias de Aguascalientes y San Luis Potosí. Esto hace que sea importante utilizar materiales de la propia región con fines de reforestación. Además, se encontró que plantas de laurel generadas *in vitro* no son genéticamente diferentes de las poblaciones de donde se tomó el material con el que se establecieron los cultivos.

Agradecimientos

Al personal del IMAE y PROESPA por la ayuda recibida para ingresar a algunas localidades. Al Dr. Pedro Castillo Lara y al M. en C. Andrés Rogelio Jiménez del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la UASLP, por la ayuda para localizar las poblaciones de laurel en la Sierra Álvarez, San Luis Potosí, y al PROMEP por el apoyo financiado para este proyecto.

LITERATURA CITADA

- ALFARO ROJAS, G.; LEGARIA SORIA J.P.; RODRÍGUEZ PÉREZ, J.E., Genetic diversity in populations of pulque-ros agaves (*Agave* spp.) in Noretheastern México State. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30: 1-12, 2007.
- BADENES, M.; GARCÉS, A.; ROMERO, C.; ROMERO, M.; CLAVE, J.; ROVIRA M.; LLACÉR, G., Genetic diversity of introduced and local Spanish persimmon cultivars revealed by RAPD markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50: 579-585, 2003.
- BUNN, E., Development of in vitro methods for ex situ conservation of *Eucalyptus impensa*, an endangered mallee from southwest Western Australia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83: 97-102, 2005.
- DÁVILA, F.C.A.; FLORES, T.F.J.; MORALES, D.J.F.; CLARK, T.R.; PÉREZ, M.B.E., Estatus poblacional y niveles de aprovechamiento del laurel silvestre (*litsea glaucescens kunth*) en Aguascalientes. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 2(4): 47-60, 2011.
- GOMES, F.; CANHOTO J.M., Micropropagation of *Eucalyptus nitens* Maiden (shining gum). *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, 39: 316-321, 2003.
- GUPTA, P.K.; MEHTA, U.J.; MASCARENHAS, A.F., A Tissue Culture Method for Rapid Clonal Propagation of Mature Trees of *Eucalyptus torelliana* and *Eucalyptus camaldulensis*. *Plant Cell Reports*, 2: 296-299, 1983.
- LARA CABRERA, S.I.; ALEJANDRE MELENA, N.; MEDINA SÁNCHEZ, E.I.; LINDIG CISNEROS, R., Genetic diversity in populations of *Lupinus elegans* Kunth, implications for ecological restoration. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32: 79-86, 2009.
- LUNA RODRÍGUEZ, M.; LÓPEZ UPTO, J.; IGLESIAS ANDREU, L.G., Morphometric and molecular (RAPD) variability in a plantation of *Pinus patula* in Veracruz, México. *Agrociencia*, 39: 231-235, 2005.
- MAO, A.A.; WETTEN, A.; FAY, M.F.; CALIGARI, P.D., In vitro propagation of *Litsea cubeba* (Lours.) Pers., a multipurpose tree. *Plant Cell Reports*, 19: 263-267, 2000.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant*, 15: 473, 1962.
- PROESPA, 2008. Especies protegidas en el estado de Aguascalientes caso: Sierra de Laurel en el municipio de Calvillo. <http://www.proespa.gob.mx/pfnm/index.html>.
- RZEDOWSKI, G.; RZEDOWSKI, J., *Flora Fanerogámica del Valle de México*. Michoacán: Instituto de Ecología. A. C. y CONABIO, 2001).
- VASIL, I.K., Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. USA: Advisory Board, Academic Press, Inc., 1986.
- WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI J.A.; TINGEY, S.V., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535, 1990.