



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

**REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *Agave marmorata* Roelz
EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL, VÍA
ORGANOGENÉISIS Y EMBRIOGENÉISIS SOMÁTICA**

ARTÍCULO QUE COMO REQUISITO INICIAL
PARA LA EVALUACIÓN PROFESIONAL DE LA
CARRERA INGENIERO AGRÓNOMO
FITOTECNISTA

PRESENTA

SANDRA YARENSSY MARTÍNEZ MARTÍNEZ

(GENERACIÓN 42)

NÚMERO DE CUENTA: 1113874

MODALIDAD

ARTÍCULO

Vo. Bo. ASESOR

DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ

CAMPUS UNIVERSITARIO "EL CERRILLO", EL CERRILLO PIEDRAS
BLANCAS MUNICIPIO DE TOLUCA, MÉXICO.

SEPTIEMBRE, 2020.



REGENERATION OF *Agave marmorata* Roelz PLANTS IN TEMPORARY IMMERSION SYSTEMS, VIA ORGANOGENESIS AND SOMATIC EMBRYOGENESIS

REGENERACIÓN DE PLANTAS DE *Agave marmorata* Roelz EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL, VÍA ORGANOGÉNESIS Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Sandra Yarensy Martínez-Martínez^a, Amaury Martín Arzate-Fernández^{a*}, Carlos Alvarez-Aragón^a, Irene Martínez-Velasco^a y Tomás H. Norman-Mondragón^a.

^aUniversidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Ciencias Agrícolas, Km 11.5 Carretera Toluca-Ixtlahuaca, 50200, Toluca, Estado de México, México. *Autor para correspondencia: amaury1963@yahoo.com.mx.

SUMMARY

Background. The genus *Agave* has social, cultural, environmental and economic importance in Mexico. Approximately 15 species of agave have been used as raw material for the elaboration of mescal, among them is *Agave marmorata* Roelz, considered the longest-lived agave for the preparation of mescal due to its maturation period of 20 to 35 years. *In vitro* propagation of agave is a technique that allows plants to be obtained via organogenesis (O) and/or somatic embryogenesis (ES) in a short time. The quality and quantity of plants propagated by these pathways can be favored with the use of Temporary Immersion Systems (SIT). **Objective.** The objective of the present investigation was to establish a protocol for the regeneration of *A. marmorata* plants by means of Temporary Immersion Systems, via organogenesis and somatic embryogenesis. **Methodology.** Two regeneration pathways were evaluated, organogenesis and somatic embryogenesis. For the first, the effect of SIT on explant sprouting and growth was determined. For the latest the germination and growth rate of somatic embryos in SIT was evaluated. **Results.** The best treatment in the sprouting stage was obtained with 80 explants cultured in SIT on an immersion frequency of 8 hours and an immersion time of 2 minutes, achieving 84% response rate, 17.5 shoots/explant with a height 1 cm. The best growth of the explants originating from the organogenesis was obtained with 180 cultured explants per bottle at a frequency of immersion of 8 hours and 2 min of immersion. The growth of the explants from somatic embryogenesis was converted with 80 somatic embryos cultured into SIT with a frequency of 8 hours. **Conclusions.** The efficiency of the use of SIT in the regeneration of agave plants via organogenesis and embryogenesis to somatic was determined.

Index words. *Agave marmorata* Roelz, organogenesis, somatic embryogenesis, Temporary Immersion Systems.

RESUMEN

Antecedentes. El género *Agave* tiene importancia social, cultural, ambiental y económica en México. Aproximadamente 15 especies de agave se han empleado como materia prima para la elaboración de mezcal, entre ellas se encuentra *Agave marmorata* Roelz, considerado el agave más longevo para la preparación de mezcal debido a que su periodo de maduración es de 20 a 35 años. La propagación *in vitro* de agave es una técnica que permite obtener plantas vía organogénesis (O) y/o embriogénesis somática (ES) en un corto periodo de tiempo. La calidad y cantidad de plantas propagadas por estas vías se pueden favorecer con el uso de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). **Objetivo.** El objetivo de la presente investigación fue establecer un protocolo de propagación de plantas de *A. marmorata* usando Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), vía organogénesis y embriogénesis somática. **Metodología.** Se evaluaron dos vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis somática. Para la primera, se determinó el efecto de SIT sobre la brotación y el crecimiento del explante. Para la segunda, se evaluó la tasa de germinación y crecimiento de embriones somáticos en SIT. **Resultados.** El mejor tratamiento en la etapa de brotación se obtuvo con 80 explantes cultivados en SIT con una frecuencia de inmersión de 8 horas y un tiempo de inmersión de 2 min, logrando el 84% de respuesta, obteniendo 17.5 brotes/ explante con 1 cm de altura. El mejor crecimiento de los explantes originados a partir de organogénesis, se obtuvo con 180 explantes cultivados por frasco con una frecuencia de inmersión de 8 horas y un tiempo de inmersión de 2 min. Por otro lado, en embriogénesis somática, el mayor porcentaje de germinación de embriones (62.2%) se logró con 80 embriones somáticos cultivados en SIT con una frecuencia de inmersión de 8 horas. **Conclusiones.** Se demostró la eficiencia del uso de SIT en la regeneración de plantas de agave vía organogénesis y embriogénesis a somática.

Palabras clave: *Agave marmorata* Roelz, organogénesis, embriogénesis somática, Sistemas de Inmersión Temporal.

INTRODUCCIÓN

El género *Agave* es originario del continente americano, se distribuye en Estados Unidos, México, América Central y América del Sur. Está constituido por cerca de 200 especies, en México se encuentra el 75% de este grupo de plantas y 65% de ellas son endémicas (CONABIO, 2005).

Desde épocas ancestrales el agave tiene importancia socioeconómica, cultural y agroecológica. Actualmente, uno de los usos más relevantes que se le da a un número importante de especies de *Agave* es la elaboración de mezcal; actividad económica potencial de las regiones productoras de agave y considerada la bebida nacional de mayor precio en el país (CRM, 2020).

Entre las 15 especies que se emplean en la producción de mezcal, se encuentra *Agave marmorata* Roelz (CRM, 2020), su destilado es apreciado por los conocedores del mezcal por su sabor, olor y rareza. Es una especie endémica del Istmo de Tehuantepec y su inflorescencia es valorada, por los pobladores de la región, por su belleza y las propiedades curativas que se le otorgan. Sin embargo, las poblaciones silvestres se encuentran amenazadas por la sobreexplotación, la destrucción del hábitat y el aumento en la producción de mezcal; afecta más poblaciones de plantas porque es necesario cortar el tallo floreciente y eliminar toda la planta del campo.

El cultivo de tejidos vegetales se propone como una alternativa que permite la conservación, propagación masiva y mejoramiento genético de especies vegetales. La regeneración de plantas se puede realizar vía organogénesis y/o embriogénesis somática (ES), ambas vías muestran la capacidad de las células vegetales para generar órganos, tejidos u organismos completos a partir de una célula. Se han empleado distintos sistemas de cultivo, entre ellos: semisólido, líquido y recientemente se han empleado los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). El uso de SIT da como resultado mayores tasas de multiplicación y menos manipulación y mano de obra; permitiendo así la reducción de los costos de producción (Feuser *et al.*, 2003; Steinmacher *et al.*, 2011). Escalona *et al.*, (1999) desarrollaron los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT[®]) para la micropropagación de piña y, más tarde, otros estudios informaron la eficiencia de este sistema en muchas otras especies de plantas (Etienne y Berthouly, 2002; Niemenak *et al.*, 2008; Steinmacher *et al.*, 2011). Este sistema permite la automatización del proceso de micropropagación, controlar las condiciones físicas (luz, temperatura, intercambio gaseoso, etc.), disminuir los costos de producción, aumentar la productividad y eficiencia de la micropropagación (Escalona *et al.*, 1999).

Hay que considerar que al utilizar los SIT existen varios parámetros de cultivo, tales como la frecuencia y la duración de inmersión, el número de explantes cultivados, el volumen de medio líquido y el volumen del recipiente de cultivo, estos valores son importantes para optimizar un protocolo de micropropagación usando SIT (Gao *et al.*, 2015).

No se ha reportado el uso de SIT en *A. marmorata* Roelz. En función de lo anterior, el objetivo del presente trabajo es establecer un protocolo de regeneración de plantas de *A. marmorata* Roelz usando Sistemas de Inmersión Temporal, vía organogénesis y embriogénesis somática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del material vegetal

Se emplearon 550 semillas de *A. marmorata* Roelz (Am) las cuales fueron lavadas a chorro de agua con 2 ml de jabón líquido para trastes de la marca KIRKLAND[®] más dos gotas de Tween[®] 20 por 15 minutos (min), posteriormente en campana de flujo laminar se sumergieron en etanol al 70% durante un min, después en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 15 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, luego se sumergieron en 16 $\mu\text{l L}^{-1}$ de gentamicina durante 15 min, finalmente fueron estratificadas en nanopartículas de plata (AgNP's) (marca Silver Plant) en una concentración de 50 mg L^{-1} durante 24 horas (h) a 4°C.

Vías de micropropagación

En la presente investigación, la propagación masiva de plantas de Am se llevó a cabo vía organogénesis directa y embriogénesis somática.

Organogénesis directa (OD)

La propagación vía organogénesis se dividió en tres etapas:

OD Etapa 1: Germinación de semilla

Se colocaron 20 semillas previamente desinfectadas, en cada frasco de polipropileno con capacidad de 470 ml y provistos de 80 ml de medio de cultivo que consistió en sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50%, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.5 g L⁻¹ de carbón activado y 6 g L⁻¹ de agar. En todos los medios de cultivo el pH se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCl, y luego se esterilizaron a una temperatura de 121 ° C a 1.1 kg cm⁻² de presión por 20 min. Los cultivos se incubaron durante 60 días (d) a una temperatura de 25 ± 2 ° C, bajo condiciones de fotoperiodo (16 h luz y 8 h oscuridad) con luz provista por lámparas de luz blanca fluorescentes (33 μmol m⁻² s⁻¹). Se realizó un subcultivo a medio fresco a los 30 d.

OD Etapa 2: Inducción de brotación

Se emplearon 450 plántulas germinadas *in vitro*, con una altura de 5 cm aproximadamente, como explantes para la inducción de brotes. Para esto, se eliminaron las hojas y raíces, y la porción restante que contiene los tejidos meristemáticos fue cultivada en dos diferentes sistemas de cultivo: semisólido (SS) y SIT. En ambos sistemas de cultivo se empleó el medio propuesto por Arzate- Fernández *et al.*, (2020) compuesto por sales MS al 100%, adicionado con 5 mg L⁻¹ de 6-Benciladenina (BA), 30 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar como agente gelificante (excepto en SIT). Se utilizaron frascos de polipropileno de 470 ml y SIT constituidos por frascos de cristal de 940 ml, la dosificación del medio de cultivo fue 80 ml y 500 ml, respectivamente.

Para SIT se evaluaron dos frecuencias de inmersión (cada 4 y 8 h) y número de explantes cultivados (20, 40 y 80). La duración de la inmersión fue de 2 min para ambas frecuencias. En SS se cultivaron 10 explantes por frasco.

Se utilizaron tres frascos de cultivo por tratamiento para los dos sistemas de cultivo (SS y SIT). Los cultivos fueron incubados durante 60 d a una temperatura de 25 ± 2°C, bajo condiciones de fotoperiodo (16 h luz y 8 h oscuridad).

OD Etapa 3: Crecimiento de brotes

Los brotes generados, en la etapa previa, con un tamaño de 1 cm aproximadamente, se separaron del explante original y se transfirieron a SIT de 940 ml provistos de 500 ml de medio de cultivo para su crecimiento y enraizamiento. En el medio de cultivo compuesto por sales inorgánicas MS al 50%, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.5 g L⁻¹ de carbón activado, libre de reguladores de crecimiento vegetal (RCV).

Se evaluó el efecto de la cantidad de explantes cultivados, de esta manera se ensayaron tres tratamientos: 80, 120 y 160 explantes cultivados en SIT y se utilizó la frecuencia y tiempo de inmersión que resultó mejor en la etapa de brotación. Los cultivos se mantuvieron incubados durante 30 d a una temperatura de 25 ± 2 ° C, bajo condiciones de fotoperiodo (16 h luz y 8 h de oscuridad).

Embriogénesis somática (ES)

La propagación vía ES se dividió en las siguientes etapas:

ES Etapa 1: Inducción de callo embriogénico

Se colocaron 10 semillas de Am, previamente desinfectadas, en 10 cajas Petri de plástico de 100 x 15 mm provistas de 20 ml de medio de cultivo. Se empleó el medio de inducción de callo propuesto por Arzate-Fernández y Mejía-Franco (2011), el cual consiste en sales inorgánicas MS al 25%, suplementado con vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), 60 g L⁻¹ de sacarosa, 5 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 3 mg L⁻¹ de BA, 8 g L⁻¹ de agar. Los cultivos se incubaron durante 60 d a una temperatura de 25 ± 2 ° C, bajo condiciones de completa oscuridad.

Posteriormente para inducir callo embriogénico, los callos con un peso aproximado de 0.20 g fueron transferidos a frascos gerber de 125 ml provistos de 35 ml de medio de cultivo. El medio de cultivo consistió en sales inorgánicas MS al 50%, suplementado con vitaminas MS, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 10 mg L⁻¹ de BA y 8 g L⁻¹ de agar. Los cultivos se

mantuvieron incubados durante 30 d a una temperatura de 25 ± 2 ° C, bajo condiciones de fotoperiodo (16 h luz y 8 h de oscuridad).

ES Etapa 2: Maduración de embriones somáticos

Los callos embriogénicos con un peso aproximado de 0.5 g se transfirieron a frascos gerber provistos de 35 ml de medio. Se empleó el medio cultivo propuesto por Alvarez-Aragón *et al.*, (2020) compuesto por sales inorgánicas MS al 50%, 0.1 mg L⁻¹ de 2, 4-D, 30 g L⁻¹ de sacarosa y gelificado con 8 g L⁻¹ de agar. Los cultivos se mantuvieron incubados durante 30 d a una temperatura de 25 ± 2 ° C, bajo condiciones de fotoperiodo (16 h luz y 8 h de oscuridad).

ES Etapa 3: Germinación y crecimiento de embriones somáticos

Como explantes se emplearon embriones somáticos en fase escutelar generados en la etapa de maduración de ES y fueron transferidos a un medio de cultivo compuesto por sales inorgánicas MS al 50%, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.5 g L⁻¹ de carbón activado, libre de RCV.

Se evaluó el efecto de la cantidad de explantes cultivados, siendo tres tratamientos los ensayados, a saber: 20, 40 y 80 explantes cultivados en SIT de 940 ml provistos de 500 ml de medio de cultivo y se utilizó la frecuencia y tiempo de inmersión que resultó el mejor tratamiento en la etapa de brotación vía organogénesis directa. Los cultivos se mantuvieron incubados durante 30 d a una temperatura de 25 ± 2 ° C, bajo condiciones de fotoperiodo (16 h luz y 8 h de oscuridad).

Aclimatación de plántulas

Las plantas de Am regeneradas vía OD y ES, indistintamente, se lavaron con agua corriente para eliminar todo residuo del medio de cultivo y se transfirieron a charolas con cilindros de espuma fenólica (peatFOAM®) de 2.2 cm x 3.6 cm, se colocaron en un sistema de raíz flotante con solución nutritiva (Hydro solutions, distribuido por GrowCare®). Se mantuvieron durante 30 d en un microtúnel de polietileno con 50% de humedad y 27 ± 5 °C; se evaluó, indistintamente de la vía de regeneración, el porcentaje de sobrevivencia.

Después de la etapa de aclimatación, se comparó el crecimiento de las plántulas durante 60 d en dos sistemas: sustrato y semi-hidropónico. Para el sistema en sustrato, las plántulas fueron transferidas a bolsas negras de polietileno de 10 x 15 cm con un sustrato compuesto de tierra y agrolita (1:1). Para el sistema semi- hidropónico, las plántulas se colocaron en vasos de plástico blancos de 300 ml de capacidad con tepojal (con partículas de 2.5 ± 0.5 mm de diámetro), como sustrato, 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 martes, jueves y sábado. Se midió el valor inicial y final de las siguientes variables: longitud de plántula, número de hojas, número de raíces, longitud de la raíz y diámetro basal.

VARIABLES EVALUADAS

Se determinó el promedio de las siguientes:

OD Etapa 2: porcentaje de brotación ($[\text{número de explantes con brotes}] * 100 / \text{número de explantes cultivados}$), número de brotes por explante y longitud de los brotes (se midió con un vernier digital marca Steren ®).

OD Etapa 3: longitud de la plántula, longitud de la raíz, diámetro basal (las tres variables anteriores se midieron con el vernier), número de hojas y número de raíces.

ES Etapa 3: longitud de la plántula, longitud de la raíz, diámetro basal (las tres variables anteriores se midieron con el vernier) y número de hojas.

Porcentaje de plántulas aclimatadas: $(\text{número de plántulas sobrevivientes} * 100) / \text{número de plántulas aclimatadas}$ a condiciones *ex vitro*.

Crecimiento de plántulas: longitud de plántula, longitud de la raíz, diámetro basal (las tres variables anteriores se midieron con el vernier), número de hojas y número de raíces.

Análisis estadístico

En la etapa 2 de OD se evaluaron dos factores: factor a; relacionado con la frecuencia de inmersión y factor b; relacionado con el número de explantes cultivados. Para la etapa 3 de OD y ES se consideró el factor b; relacionado con el número de explantes cultivados. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza con ayuda del software Stathgraphics versión 5.0 y en donde se presentó diferencia significativa, se realizó una prueba de comparación de medias (LSD) con un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Organogénesis directa (OD)

Etapa 2: Inducción de brotación en *A. marmorata* Roelz

Se evaluó la inducción de brotación de Am utilizando SIT, donde se observó un 80% de respuesta del tejido vegetal y 17.5 brotes/explante, un resultado significativamente superior a lo obtenido con el medio semisólido (Tabla 1). Este resultado concuerda con lo reportado por Ross y Castillo (2010) quienes, empleando SIT, lograron incrementar la multiplicación de *Achyrocline flaccida* de 4 a 11 brotes/explante cambiando de un sistema semisólido a SIT; Castro y González (2002) lograron en *Eucalyptus grandis* una tasa de multiplicación de 11.5 brotes por explante, y Alvarenga y Salazar (2015) obtuvieron hasta 13 brotes por explante en *Stevia rebaudiana*. Una posible razón de mayor eficiencia en la producción de brotes en SIT es que las plantas en medio líquido tienen mejor transferencia y acceso a la absorción de nutrientes (Gao *et al.*, 2015).

Tabla 1. Comparación de dos sistemas de cultivo en la etapa 2 de OD: semisólido (SS) y Sistemas de Inmersión Temporal (SIT); con diferentes frecuencias de inmersión y número de explantes cultivados en la inducción de brotes de *A. marmorata* Roelz a los 60 d en medio de inducción.

Sistema de cultivo	Frecuencia de inmersión (h)	Nº explantes cultivados/SIT	Volumen de medio de cultivo/explante (ml)	% de respuesta	Nº brotes/explante	Altura de brote/explante (cm)
Semisólido	Na	10	8	20	2.5 ^e	1.1 ^a
		20	25	60	3.3 ^{de}	0.6 ^c
SIT	4	40	12.5	55	4.5 ^d	0.6 ^c
		80	6.25	89	4.4 ^d	0.8 ^b
	8	20	25	75	7.1 ^c	1.0 ^{ab}
		40	12.5	83	10.3 ^b	0.9 ^{ab}
		80	6.25	84	17.5 ^a	1.0 ^{ab}

Letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa (P<0.05). na= no aplica.

En el presente trabajo la aparición de los primeros brotes en la zona meristemática del tallo (Figura 1.A) comenzó a partir de los quince días después de ser cultivados en el medio de brotación. El número de brotes por explante se vio afectado por la frecuencia de inmersión, logrando el mayor número de brotes (7.1, 10.3 y 17.5) con una frecuencia de 8 h, independientemente del número de explantes por contenedor. Esto concuerda con lo obtenido por Steward *et al.* (1952) quienes atribuyeron una mejor respuesta respecto al número de brotes en *Daucus carota* a un suministro de aire mediante inmersión alterna. Los SIT cuentan con un sistema de propulsión neumática del medio de cultivo que causa una ventilación forzada y provocan la renovación completa de la atmósfera de cultivo en cada inmersión. Etienne y Berthouly (2002) atribuyen un efecto positivo en los explantes debido a la ventilación forzada con aire que contiene concentraciones de gas y la humedad relativa del frasco.

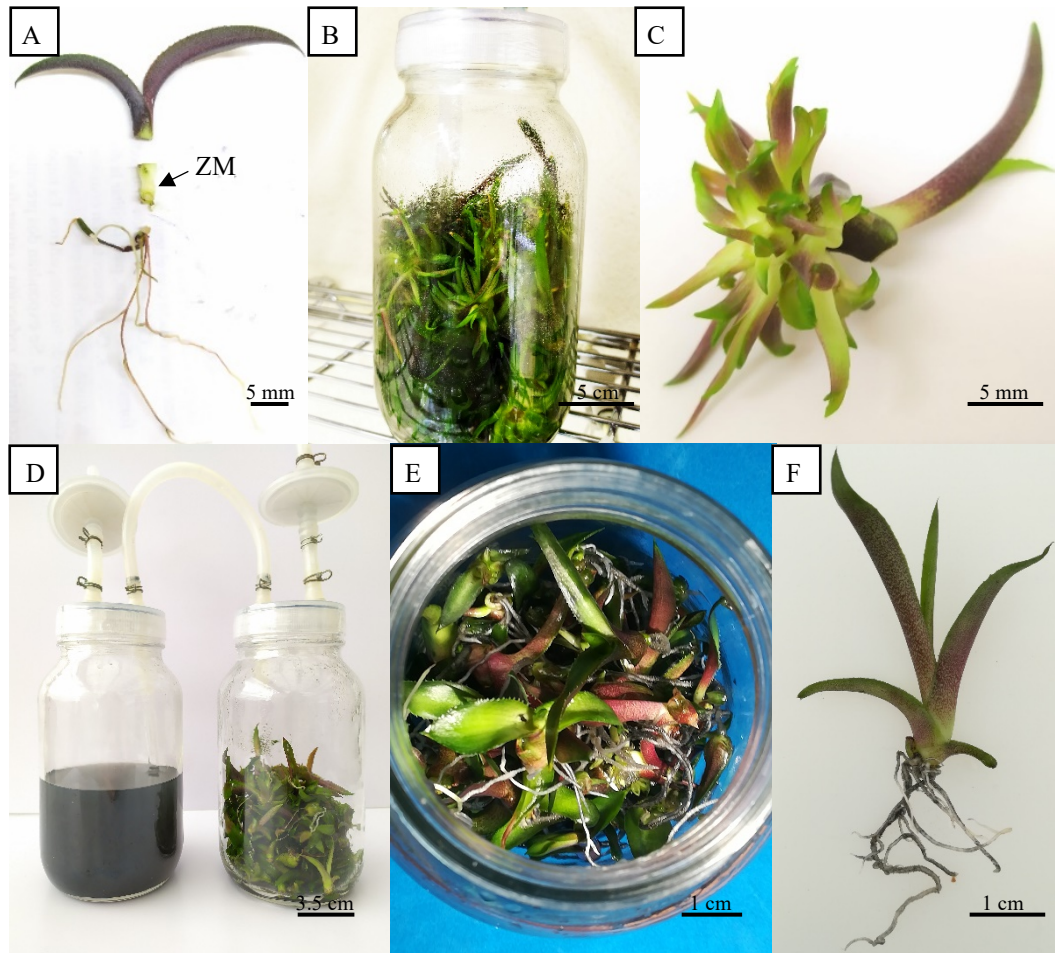


Figura 1. Regeneración de plantas de *A. marmorata* Roelz, vía organogénesis directa usando SIT. A) Explante seleccionado (la flecha indica la zona meristemática: ZM) para la etapa de inducción de brotación B) SIT en el tratamiento con 80 explantes en etapa de brotación. C) Explante con brotes, originado a partir del tratamiento con 80 explantes cultivados y frecuencia de inmersión de 8 h en SIT a los 120 días después de iniciado el cultivo (ddic). D) SIT con 180 explantes en la etapa de crecimiento a los 150 ddic. E) Plántulas regeneradas de Am vistas desde la boca del SIT. F) Plántula enraizada a los 150 ddic.

Se logró un porcentaje de respuesta más alto cuando se usó un volumen de medio de cultivo de 6.25 ml por explante (80 explantes cultivados) en el SIT (Figura 1.B y 1.C). Los volúmenes superiores a 6.25 ml de medio por explante (12.5 y 25 ml) disminuyeron la tasa de multiplicación (Tabla 1). Lorenzo *et al.*, (1998) demostró que existe un volumen de medio óptimo para la proliferación de brotes de caña de azúcar, que se estimó en 50 ml / explante. En el presente trabajo, con volúmenes menores se observó un aumento en el porcentaje de respuesta, una posible explicación radica en la excreción de algunos compuestos químicos que favorecen la formación de brotes, ya que estos compuestos se diluyen al utilizar grandes volúmenes de medio de cultivo como ocurre en el SIT. Williams (1995) menciona que los tejidos vegetales pueden contribuir a cambios en el medio de cultivo, ya sea por absorción de sustancias del medio o exudación al medio. Aparte de la exudación de compuestos fenólicos u otras toxinas, los cationes y aniones exudados, o ácidos orgánicos, pueden alterar el pH del medio. Por su parte Escalona *et al.*, (1999) sugieren que el cambio de pH en el medio de cultivo de *Ananas comosus* en SIT puede atribuirse a la captación o excreción diferencial de iones NO_3^- y NH_4^+ y / o acumulación de ácido carbónico como consecuencia de metabolismo del ácido crasuláceo.

Etapa 3: Crecimiento de brotes

Las variables número de hojas, número de raíces y diámetro basal no presentaron diferencia significativa. Sin embargo, la longitud de plántula y longitud de raíz fueron estadísticamente significativas (Tabla 2). Los valores más altos en la longitud de plántula, 4 y 4.5 cm, se obtuvieron al cultivar 120 y 180 explantes en SIT (Figura 1.D y 1.E), respectivamente, contrario a lo reportado en otras especies como en *Psidium guajava* (Feria-Silva et al., 2003) donde con un menor número de explantes cultivados en SIT se logró una mayor longitud de plántula. Por otro lado, Angeles-Spino et al., (2012) en *A. tequilana* Weber obtuvieron una longitud menor de plántula (3.48 cm) empleando un sistema semisólido.

Tabla 2. Efecto del número de explantes cultivados en el crecimiento de la plántula de *A. marmorata* Roelz obtenidas de OD en SIT.

Nº de explantes cultivados	Longitud de plántula (cm)	Longitud de raíz/brote (cm)	Nº de hojas/brote	Nº de raíces/brote	Diamétero basal/brote (mm)
80	2.8 ^b	0.9 ^b	3.4 ^a	1.6 ^a	5.3 ^a
120	4.0 ^a	1.2 ^b	2.7 ^a	0.9 ^a	6.0 ^a
180	4.5 ^a	3.3 ^a	2.9 ^a	1.6 ^a	6.6 ^a

Letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

Se puede observar en la Tabla 2 que con 180 explantes cultivados, el crecimiento de las plántulas a los 30 d en el medio de cultivo para crecimiento se vio favorecido con más de 3.5 cm de crecimiento en todos los explantes. Lo anterior concuerda con lo reportado por Eun-Joo y Kee-Yoep (2005) en *Chrysanthemum* quienes, para determinar la densidad de cultivo óptima de los brotes individuales en un biorreactor, colocaron diferentes números de brotes individuales (20, 40, 60 y 80) en un biorreactor de columna de 10 litros y obtuvieron una longitud del brote mayor con 80 brotes cultivados, lo que indica la mejor densidad de cultivo probada para la multiplicación de brotes en biorreactores en esta especie.

Con los resultados obtenidos en la etapa de crecimiento de brotes se puede permitir el cultivo de una mayor cantidad de explantes por contenedor, conservando y/o aumentando el vigor de las plántulas, esto se podría traducir en una disminución de los costos de producción a nivel comercial. De acuerdo con Etienne y Berthouly (2002) los parámetros clave para disminuir los costos de producción son: una reducción en el número de contenedores y en el manejo de materiales, eliminación de corte y siembra, y reducción de los niveles de contaminación. Por lo tanto, al cultivar los recipientes con 180 explantes se disminuye en más del 50% el área de la sala de incubación requerida en esta etapa y se duplica la cantidad de explantes/contenedor comparado con el cultivo de 80 explantes en la etapa 2.

Un problema importante relacionado con el uso de medios líquidos en SIT es la hiperhidricidad (vitrificación), es decir, la malformación morfogénica (Ziv, 2005). En el presente estudio, en ninguna de las etapas del proceso de propagación vía OD se presentó hiperhidricidad, se lograron producir brotes vigorosos y el crecimiento de estos se presentó sin anomalías morfológicas (Figura 1.F). Esto coincide con lo reportado por Alvard et al., (1993) en la micropropagación de banano, quienes no informaron de ningún síntoma de hiperhidricidad en los brotes cultivados en un sistema de inmersión temporal, mientras que los tallos sumergidos en un medio líquido con aireación continua de burbujas revelaron hiperhidricidad en las vainas externas de las hojas.

Embriogénesis somática (ES)

Etapa 1: Inducción de callo embriogénico

La desdiferenciación de los ejes embrionarios cigóticos maduros se observó a los 5 días, iniciando con la formación de callo en forma de bellota en la zona meristemática apical, debajo de la cobertura cónica que rodea al ápice (cofia), presentando una coloración beige y blanco, respectivamente (Figura 2.A). Esta coloración está relacionada con los altos contenidos de auxina y bajo contenido de citoquinina (Portillo et al., 2007) y la ausencia de luz que inhibe el funcionamiento de los cloroplastos. Se observó un 100% de formación de callo en los explantes, obteniendo un peso

de 0.5 g por explante a los 60 ddc. La inducción de callo embriogénico (Figura 2.B) se logró a los 90 ddc en el 70% de los explantes, formando callos friables de coloración verde a amarillo traslúcido. La coloración verde se debe principalmente a las altas concentraciones de citoquininas (BA) que incrementan el contenido de clorofila a través de la diferenciación de cloroplasto y por consiguiente la capacidad fotosintética (Portillo *et al.*, 2007).

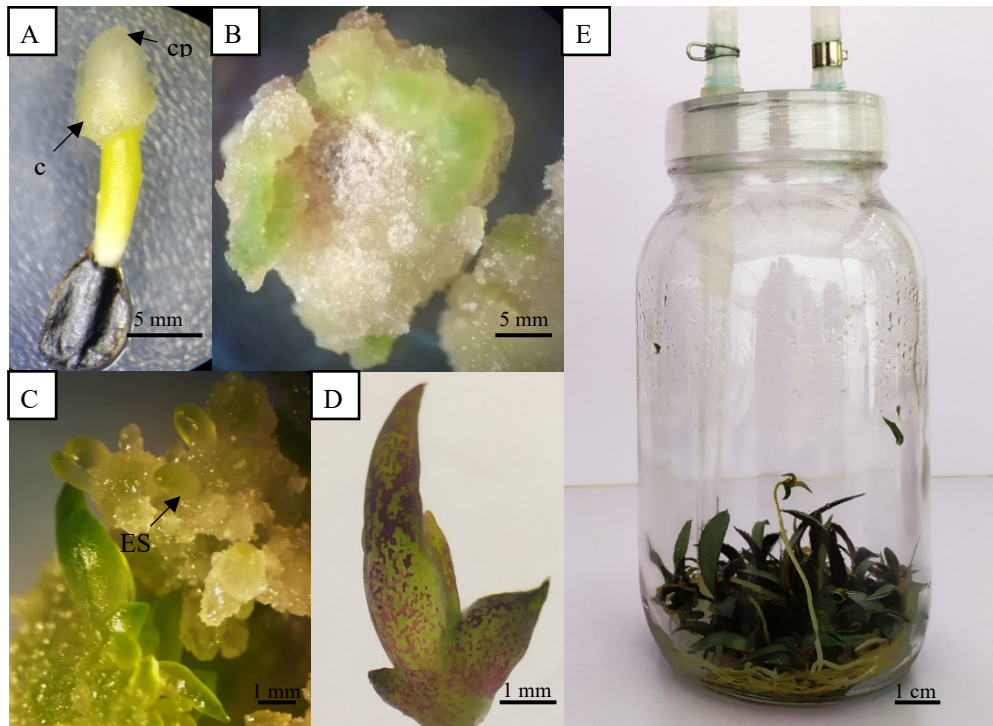


Figura 2. Regeneración de plántulas de *A. marmorata* Roelz, vía embriogénesis somática usando SIT. A) Desdiferenciación celular del embrión cigótico a los 5 ddc. B) Callo embriogénico a los 90 ddc. C) Embriones somáticos en estado escutelar. D) Embrión germinado de *A. marmorata* Roelz. E) Plántula regenerada a partir de ES a los 150 ddc. cp=cofia; c=callo.

Etapas 2: Maduración de embriones somáticos

Los embriones somáticos en fase escutelar (Figura 2.C) a los 120 ddc alcanzaron su madurez en la periferia del callo embriogénico, observándose 20 embriones aproximadamente en 0.25 g de callo. Alvarez-Aragon *et al.* (2020) obtuvieron una respuesta similar (19.4 embriones somáticos) utilizando la misma concentración de BA (10 mg L^{-1}) y sugieren que esto se puede deber a que las citoquininas incrementan 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).

Etapas 3: Germinación y crecimiento de embriones somáticos

La germinación de los embriones somáticos se llevó a cabo en SIT encontrando que entre mayor número de explantes cultivados (80 explantes) mayor es el porcentaje de germinación de embriones somáticos (62.2%) (Tabla 3) (Figura 2.D). Cabe señalar que existió una relación entre el número de explantes cultivados en cada SIT y el porcentaje de hiperhidricidad observado. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Portillo y Santacruz-Ruvalcaba (2006) en *Agave tequilana* Weber var. Azul, en donde probaron un sistema de inmersión temporal (Orbitation[®]) para embriogénesis somática y en la etapa de germinación de embriones obtuvieron 50% de hiperhidricidad con inmersión de 1 min cada 48 h. Se sabe que este desorden fisiológico en el cultivo *in vitro* es producto de diferentes condiciones de estrés ocasionadas por elevados niveles de humedad, potencial hídrico, concentraciones de RCV, intensidad

lumínica y acumulación de gases en la atmósfera de cultivo (Abdelnour *et al.*, 2011). Por su parte, Paek *et al.*, (2005) sugieren que la hiperhidricidad se puede controlar ajustando los tiempos de inmersión. De acuerdo con Teisson y Alvard (1995) la frecuencia y duración de la inmersión tuvo un efecto directo en el desarrollo de embriones de *Coffea* sp., además las condiciones óptimas de inmersión dependen de la especie, pues en el caso de *Coffea canéfora*, cuando se emplearon cuatro inmersiones al día de 15 min cada una, las cuales se aplicaron con éxito a *Coffea arabica*, hubo un alto porcentaje de hiperhidricidad, el cual se redujo cuando se cambió a dos inmersiones de 1 min por día. Berthouly y Etienne (2005) observaron que, en café, los riesgos de hiperhidricidad son mayores en las etapas de germinación y conversión en plantas regeneradas vía embriogénesis somática.

Tabla 3. Efecto del número de explantes cultivados, en la germinación de embriones somáticos de *A. marmorata* Roelz usando SIT.

Número de explantes cultivados	Germinación de embriones somáticos (%)	Hiperhidricidad (%)
20	47.5	52.5
40	54.9	45.1
80	62.2	37.8

La morfología de los embriones somáticos de Am germinados en SIT tuvo mejores resultados cuando se cultivaron 80 explantes (Figura 3). La disminución del volumen de medio de cultivo/explante tuvo un efecto positivo, permitiendo el correcto desarrollo del explante y una mayor longitud de plántula (2.97 cm), longitud de raíz (7.27 cm) y diámetro basal (3.85 mm). Se observó el 100% de enraizamiento en todas las plántulas regeneradas *in vitro* a partir de ES (Figura 2.E). Concordando con Etienne *et al.* (1999) quienes en *Coffea arabica* encontraron un efecto en el número de explantes cultivados altamente significativo con respecto a la longitud de los ejes embrionarios, peso fresco y longitud de la planta.

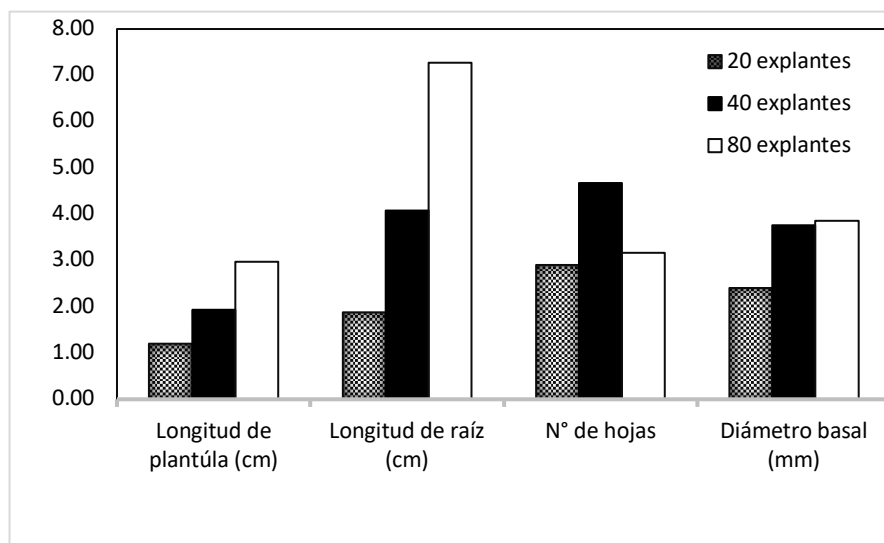


Figura 3. Efecto del número de embriones somáticos de *A. marmorata* Roelz cultivados, en SIT en la etapa de crecimiento.

Propagación vía organogénesis vs. embriogénesis somática

El cultivo de tejidos vegetales ha sido utilizado con diversos fines en diferentes especies del género *Agave* desde hace muchos años, tal es el caso de la propagación por medio de proliferación de yemas axilares, organogénesis y embriogénesis somática. Como explante se han empleado secciones de hoja, tallo, brotes micropropagados y semillas. En la presente investigación para la regeneración de plántulas vía OD se requirió de un mayor número de explantes

iniciales (450 semillas). Sin embargo, la regeneración de plántulas a través de organogénesis es la aplicación más amplia en el cultivo de tejidos vegetales (Pérez-Molphe, 1999). En contraste con lo anterior, la ES tiene la ventaja de requerir un menor número de explantes iniciales (100 semillas) y esta vía de regeneración tiene varias ventajas sobre la organogénesis, aunque no tan fácil de lograr. Entre ellas se encuentra la eficiencia del proceso, lo cual se traduce en la regeneración de plantas en menos pasos; debido a que una vez que se obtiene el callo embriogénico éste se puede seguir multiplicando, conservando, reduciendo el trabajo, tiempo, costo y facilitando el escalamiento a la automatización del proceso empleando SIT. Además, la organogénesis es el proceso por el cual las células y los tejidos se ven obligados a sufrir cambios que conducen a la producción de una estructura unipolar, es decir, un primordio de brote o raíz, cuyo sistema vascular a menudo está conectado al explante inicial. Por el contrario, la embriogénesis somática conduce a la producción de una estructura bipolar que contiene un eje raíz/brote (Thorpe, 1993). De esta forma la organogénesis requiere una etapa para enraizamiento que en ES es eliminada.

Por otro lado, la regeneración vía OD no mostró signos de hiperhidricidad en comparación con ES. Esto concuerda con lo reportado por Watt (2012) quien menciona que la hiperhidricidad del material cultivado está afectado por la frecuencia de inmersión, el SIT empleado y la vía de regeneración. Es por esto último, que se debe tomar en cuenta que el estado fisiológico del tejido vegetal afectará la interacción celular con las señales ambientales y determinará los eventos de desarrollo, proliferación y crecimiento (Preil, 2005).

Se observó el comportamiento de *A. marmorata* Roelz respecto al número de explantes cultivados en SIT con ambas técnicas de regeneración (OD y ES). En OD se registró un incremento en el porcentaje de brotación, número de brotes/explante, y en ES se determinó un incremento en el porcentaje de germinación de embriones somáticos, longitud de la planta, longitud de la raíz, número de hojas y diámetro basal, cuando se empleó un mayor número de explantes cultivados y por ende menor volumen de medio de cultivo/explante. Esto probablemente se deba a que *A. marmorata* Roelz es una planta suculenta con metabolismo ácido crasuláceo y la anatomía de estas plantas les permite almacenar agua en sus células, tejidos y órganos, haciendo que su eficiencia en el uso del agua sea mayor respecto a las plantas con metabolismo C3 y C4 (Nobel, 2011).

Independientemente de la diferencia en la vía de regeneración (organogénesis directa vs embriogénesis), ambos tipos de sistemas de micropropagación establecidos en el presente estudio para *A. marmorata* Roelz podrían usarse como un método de regeneración *in vitro* para otros cultivares. Sin embargo, es necesario estudiar las variaciones genéticas del material regenerado por ambas vías, ya que se ha comprobado que varios factores en el cultivo *in vitro* pueden generar variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981).

La comprensión de las señales y mecanismos que controlan la organogénesis y la embriogénesis somática en medios líquidos avanzará en gran medida el uso de sistemas de inmersión temporal para la micropropagación comercial. El microambiente inmediato, tanto factores químicos como físicos, es el factor principal involucrado en el control de la regeneración normal de las plantas.

Aclimatación de plántulas

Durante la aclimatación la coloración verde de las hojas se hizo más intenso, lo que sugiere un aumento en la actividad de los cloroplastos, y después de 2 semanas surgieron nuevas hojas y raíces y con ello un 100% de aclimatación en plántulas de *A. marmorata* Roelz a las tres semanas de iniciada la aclimatación. Las plántulas se establecieron con éxito en las charolas con cilindros de espuma fenólica (Figura 4.A). Paek *et al.*, (2005) mencionan que la optimización de la frecuencia de inmersión en biorreactores en muchos casos conduce a plántulas de excelente calidad que pueden aclimatarse fácilmente debido probablemente al intercambio gaseoso que se realiza en los SIT y que puede estimular el funcionamiento de las estomas durante el cultivo *in vitro*. Esto concuerda con lo reportado por Escalona *et al.*, 1999 quienes en las etapas de aclimatación y enraizamiento *ex vitro* de brotes de *Ananas comosus* producidos en SIT lograron aclimatar exitosamente plántulas de 6 cm de longitud.

El sistema de cultivo semi-hidropónico tuvo un efecto significativo en el crecimiento de las plántulas en comparación con las plántulas establecidas en sustrato (Tabla 4), logrando un crecimiento de 6.3 cm de longitud de plántula, 5.6 cm de longitud de raíz, 11 mm de diámetro basal un aumento de 2.5 hojas y 8.8 de raíces (Figura 4.C) valores superiores a los alcanzados con sustrato. En la figura 4.B y 4.D se observa la diferencia de crecimiento vegetativo de las plantas regeneradas, en la primera se nota un mayor número de hojas y una mayor longitud. En las figuras 4.C y 4.E se aprecia el sistema radicular generado en las plantas después de 90 días en la etapa de crecimiento *ex vitro*, nótese un mayor número de raíces y la longitud de estas, en el sistema de cultivo semi-hidropónico.

Tabla 4. Comparación de dos sistemas de cultivo (sustrato vs semi-hidropónico) en el crecimiento de plántulas de *A. marmorata* Roelz regeneradas *in vitro* en condiciones *ex vitro*.

TIPO DE SISTEMA	lpi	lpf	cp	lri	lrf	cr	Nhi	nhf	ch	nri	nrf	cnr	dbi	dbf	cdb
	Cm												mm		
SUSTRATO	4.9	5.1	0.2 ^b	5.3	6.0	0.7 ^b	3.4	4.5	1.1 ^b	2.4	4.6	2.2 ^b	7.3	10.1	2.8 ^b
SEMI-HIDROPÓNICO	4.5	10.8	6.3 ^a	3.7	9.3	5.6 ^a	3.3	5.8	2.5 ^a	1.1	9.9	8.8 ^a	5.0	16.0	11. ^a

lpi=longitud de plántula inicial, lpf= longitud de plántula final, cp= crecimiento de plántula, lri= longitud de raíz inicial, lrf=longitud de raíz final, cr=crecimiento radicular, nhi= número de hojas inicial, nhf= número de hojas final, ch= crecimiento de hojas, nri= número de raíces inicial, nrf= número de raíces final, cnr= crecimiento de número de raíces, dbi= diámetro basal inicial, dbf=diámetro basal final, cdb= crecimiento de diámetro basal. Letras iguales significa que no hay diferencia estadísticamente significativa (P<0.05).

La respuesta del cultivo en sustrato, a un menor valor en el crecimiento de plántula (0.2 cm), crecimiento radicular (0.7 cm), numero de hojas (1.1 hojas), numero de raíces (2.2 raíces) y diámetro basal (2.8 mm) comparada con el sistema semi-hidropónico (6.3 cm, 5.6 cm, 2.5 hojas, 8.8 raíces y 11 mm, respectivamente) podría relacionarse con una limitación en la humedad del suelo. En cuanto al abastecimiento de nutrimentos al sistema radical en sustrato, éste también es un factor que está ligado estrechamente a la absorción de agua debido a que los nutrimentos podrían ser rápidamente agotados por las raíces si no se liberan nuevos iones de la fase sólida (Salisbury y Ross, 1994); en este aspecto, la disponibilidad de nutrimentos en el sustrato es menor comparado con el sistema semi-hidropónico.

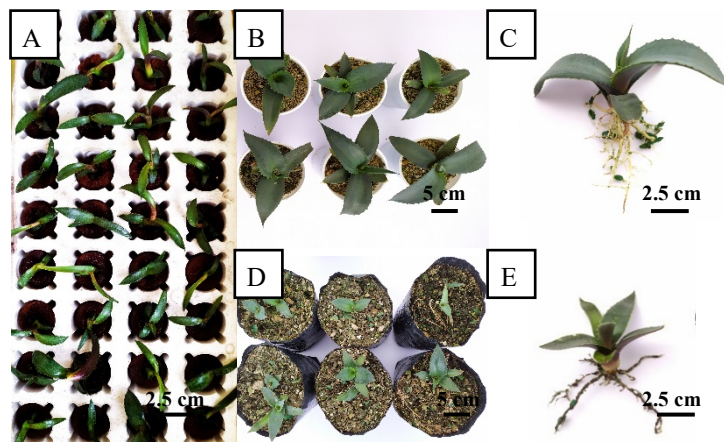


Figura 4. Aclimatación y crecimiento de plantas regeneradas de *A. marmorata* Roelz en condiciones *ex vitro*. A) Plantas de *A. marmorata* Roelz en charola con cilindros de espuma fenólica a los 180 ddc. B y C) Plantas desarrolladas en un sistema semi-hidropónico a los 240 ddc. D y E) Plantas desarrolladas en sustrato a los 240 ddc.

Por otra parte, hay otros factores que afectan la disponibilidad de nutrimentos en el suelo, como: la concentración, la capacidad amortiguadora y las condiciones de difusión (Mengel y Kirkby, 1978). En un sistema semi-hidropónico, todos los nutrimentos se encuentran en forma iónica en la solución y su acceso es inmediato, contrario al sustrato, donde existen diversas fuerzas fisicoquímicas que podrían limitar su disponibilidad.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados son el primer reporte que sugieren la posibilidad de producción a gran escala de brotes y embriones somáticos de *A. marmorata* Roelz a través de sistemas SIT.

En la presente investigación se logró la regeneración de brotes y embriones somáticos mediante SIT. Sin embargo, el mayor número de plántulas regeneradas por explante se alcanzó utilizando la técnica de ES con 20 embriones/explante. La inmersión de 2 min cada 8 h resultó la más eficiente en ambos sistemas de micropropagación (OD y ES).

En la propagación vía organogénesis directa el mayor número brotes por explante se obtuvo en un SIT de 940 ml con 80 explantes cultivados (zona meristemática basal) con una frecuencia de inmersión de 2 min cada 8 h y un volumen de medio de 500 ml, para el crecimiento y enraizamiento de los brotes resultó eficiente el cultivo de 180 brotes en cada frasco de cultivo. Para la propagación vía embriogénesis somática a partir de 80 explantes cultivados se logró el 62.5% de germinación, crecimiento y enraizamiento de los embriones somáticos con una frecuencia de inmersión de 2 min cada 8 h.

Todas las plántulas regeneradas se adaptaron a condiciones *ex vitro*, logrando un mayor desarrollo y crecimiento aquellas que se colocaron en un sistema semi-hidropónico.

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

Conflicto de interés. Los autores declaran que no existe conflicto de intereses asociados con los resultados de esta publicación. Así mismo manifestamos la conformidad con el contenido del escrito y con los procedimientos editoriales de la revista Tropical and Subtropical Agroecosystems.

Cumplimiento de estándares de ética. 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), previa solicitud.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour A., Aguilar, M.A. y Valverde, L. 2011. MICROPROPAGACIÓN DE PILÓN (*Hieronyma alchorneoides*). *Agronomía Costarricense* 35(2): 9-19.
- Alvard, D., Cote, F. y Teisson, C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 32: 55-60. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00040116>
- Alvarenga, S., y Salazar, T. 2015. Micropropagación masiva de *Stevia rebaudiana* Bertoni en sistemas de inmersión temporal. *Cultivos Tropicales*. 36(3): 50-57.
- Alvarez-Aragón, C., Arzate-Fernández, A. M., Martínez-Martínez, S.Y., y Martínez-Velasco, I. 2020. Regeneración de plantas de *Agave marmorata* Roelz, vía embriogénesis somática. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 23(36): 1-16.
- Angeles-Spino, A., Valencia-Botín, A. J., Virgen-Calleros, G., Ramírez-Serrano, C., Paredes-Gutiérrez, L. y Hurtado-De la Peña, S. 2012. Micropropagación de agave (*Agave tequilana* Weber. var. azul) a través de yemas axilares. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15 (2012): 693 - 698
- Arzate-Fernández, A. M. y Mejía-Franco, R. 2011. Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Rev. Fitotec. Mex.* 34(2): 101-106.
- Arzate-Fernández, A. M, Martínez-Velasco, I., Alvarez-Aragón, C., Martínez-Martínez, S. Y., y Norman-Mondragón, T. H. 2020. Respuesta morfogénica de dos especies de *Agave* regeneradas *in vitro*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 23(47): 1-17.

- Castro, D., y González, J. 2002. Eucalyptus (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) micropropagation in a temporary immersion system. *Agricultura Técnica*. 62(1):68-78.
- Berthouly, M., Etienne, H. 2005. Sistema de inmersión temporal: un nuevo concepto de uso de medio líquido en la propagación masiva. En: Hvoslef-Eide AK, Preil W. (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht. DOI: https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_11
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2005. Mapa Mezcales y Diversidad. © Conabio, México.
- Consejo Regulador del Mezcal (CRM). 2020. Informe estadístico. Consultado: 20 de mayo 2020. http://www.crm.org.mx/PDF/INF_ACTIVIDADES/INFORME2019.pdf
- Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, M., González, J., Desjardins, Y., y Borroto, C. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18: 743–74
- Etienne, B., Bertrand, D., B., Vásquez, N., y Etienne, H. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and the regeneration of plants. *Plant Cell Rep.* 19:111-117.
- Etienne y Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215–231.
- Eun-Joo, H., y Kee-Yoep, P. 2005. Multiplication of *Chrysanthemum* shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 143–153. Springer. Printed in the Netherlands.
- Feria-Silva, M., Chávez-Milián, M., Quiala-Mendoza, E., y Jiménez-González, E. 2003. Efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión en la propagación *in vitro* de *Psidium guajava* cv. Enana roja en sistemas de inmersión temporal. *Biotechnología Vegetal*. 3(3): 149 – 154.
- Feuser, S., Meler, K., Daquinta, M., Guerra, M., y Nodari, R. 2003. Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72, 221–227. <https://doi.org/10.1023/A:1022321405683>
- Gao, M., Jiang, W., Wei, S., Lin, Z., Cai, B., Yang, L., Luo, C., He, X., Tan, J., y Chen, L. 2015. High-efficiency propagation of Chinese water chestnut [*Eleocharis dulcis* (Burm.f.) Trin. ex Hensch] using a temporary immersion bioreactor system. *Plant Cell Tiss Organ Culture*. 121:761–772. DOI 10.1007/s11240-015-0732-4.
- Larkin, P.J. y Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor Appl Genet*, 60: 197-214
- Lorenzo, J., González, B., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P., y Borroto, C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 197–200.
- Mengel, K. y Kirkby, E.A. 1978. Principles of plant nutrition. International Potash Institute. Berne, Switzerland.
- 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., y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nobel, P.S. 2011. *Sabiduría del desierto: agaves y cactus*. Ed. Bba.México.
- Niemenak N, Saare-Surminski K, Rohsius C, Ndoumou DO, Lieberei R.2008. Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant Cell Reports* 27: 667–676
- Paek, K., Chakrabarty, D., y Hahn, E. 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants. A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 95–116. Springer. Printed in the Netherlands.
- Pérez- Molphe, E. M., 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Phillips, G.C., y Collins, G.B. (1979). In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop Sci.* 19, 59–64.
- Portillo, L., y Santacruz-Ruvalcaba, F. 2006. Factibilidad de uso de un nuevo sistema de inmersión temporal (Orbitabion®) para embriogénesis somática de *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *Bol. Nakari* 2006, 17(2):43-48.
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A., y Rodríguez-Garay, B. 2007. Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant*. 43:569–575 DOI 10.1007/s11627-007-9046-5.
- Preil, W. 2005. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. *Liquid culture systems for in vitro plant propagation*. 1-18.
- Ross, S., y Castillo, A. 2010. Micropropagación de *Achyrocline flaccida* (Weinm.) DC. en medios de cultivo líquidos. *Agrociencia* 16 (1): 1 – 7.
- Salisbury, F.B. y Ross, C.W. 1994. *Fisiología vegetal*. Trad. al español por V. González Velásquez. 4a ed. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F.

- Steinmacher, D. A., Guerra, M. P., Saare-Surminski, K., y Lieberei, R. 2011. A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis, *Annals of Botany*. 108(8): 1463–1475, <https://doi.org/10.1093/aob/mcr033>.
- Steward, F. C., Caplin, S. M., y Millar, F. K. 1952. Investigations on Growth and Metabolism of Plant Cells: I. New Techniques for the Investigation of Metabolism, Nutrition and Growth in Undifferentiated Cells, *Annals of Botany*. 16(1):57–79. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a083303>.
- Teisson, C. y Alvard, D. 1995. A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary immersion. In: M. Terzi et al. (eds.) *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology* (pp 105-110). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Thorpe, T. E. 1993. In vitro organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. K. A. Roubelakis-Angelakis et al. (eds.), *Morphogenesis in Plants*, 19-38. © Springer. Media New York.
- Watt, M.P. 2012. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*. 11(76): 14025-14035.
- Williams, R.R. 1995. The chemical microenvironment. 1. Aitken-Christie, T. Kozai & M. Lila Smith (eds.), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*, 405-439. Kluwer Academic Publishers.
- Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 21–40. © 2005 Springer. Printed in the Netherlands.