



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS CÓRDOBA

PROGRAMA DE POSGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA  
SUSTENTABLE

## MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE AGAVE TOBALÁ (*Agave potatorum* Zucc.) UTILIZANDO UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

LORENA CORREA HERNÁNDEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO

2021

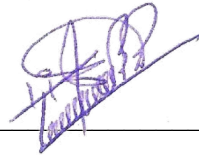
MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DE AGAVE TOBALÁ (*Agave potatorum* Zucc.)  
UTILIZANDO UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

La presente tesis, titulada **Multiplicación *in vitro* de agave tobalá (*Agave potatorum* Zucc.) utilizando un sistema de inmersión temporal** realizada por la alumna: **Lorena Correa Hernández**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE**

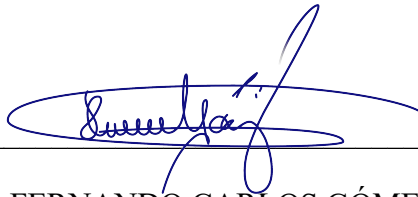
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. JERICÓ JABÍN BELLO BELLO

ASESOR:



DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO

ASESOR:



DR. JOSÉ HUMBERTO CAAMAL VELÁZQUEZ

Amatlán de los Reyes, Veracruz, México, enero del 2021

## AGRADECIMIENTOS

Realizar el proyecto del presente documento no hubiese sido posible sin el apoyo de las siguientes personas e instituciones.

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT):** Gracias por el financiamiento de mi estudio de posgrado y dar la oportunidad a muchos jóvenes de incursionar en la ciencia.

**Colegio de Postgraduados campus Córdoba:** Agradezco por permitirme hacer de esta institución una segunda casa. Así mismo, agradezco la disponibilidad de todo el personal académico y administrativo que siempre estuvo al pendiente de nuestro seguimiento. Gracias por hacer notoria la ciencia en esta zona.

**Dr. Jericó J. Bello Bello:** Gracias por creer en mí y ayudarme a desarrollar nuevas habilidades; por ser exigente y enseñarme que todo tiene solución si aprendo a buscar. Me llevo a un buen líder y un buen amigo.

**A mi familia:** A mis padres por el apoyo incondicional y aguantarme en mis malos ratos; a mis hermanas por siempre sacarme una sonrisa y aguantarme en mis malos rato. A los abuelos que están y los que se fueron en el proceso.

**M. Daniel:** Por proveer conocimiento y siempre estar disponible en cualquiera de mis dudas.

**M. Eduardo Martínez:** Gracias por tu vocación, por enseñarme todas las bases de CTV y por contagiar tus ganas y pasión. Por siempre un maestro Jedi.

MUPLICACIÓN *IN VITRO* DE AGAVE TOBALÁ (*Agave potatorum* Zucc.)  
UTILIZANDO UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

Lorena Correa Hernández, M. C.

Colegio de postgraduados, 2021.

*Agave tobalá* (*Agave potatorum* Zucc) es importante para la producción de una bebida alcohólica llamada mezcal. El objetivo de este estudio fue desarrollar un protocolo para la micropropagación comercial de *A. potatorum* utilizando un Sistema de Inmersión Temporal (SIT). Se evaluaron diferentes condiciones de cultivo en inmersión temporal, utilizando el biorreactor de flujo y reflujo y medio semisólido como tratamiento control en etapa de multiplicación. En inmersión temporal se evaluaron diferentes frecuencias de inmersión (2 min cada 4, 8, 12 y 16 h), volumen de medio por explante (100, 75, 50 y 25 mL) y suministro de aire adicional (2 min cada 4, 8, 12 y 16 h). En todos los experimentos se evaluó el porcentaje de hiperhidricidad, número y longitud de brotes por explante y contenido total de clorofilas, a los 60 d de cultivo. Además, se evaluó el porcentaje de supervivencia durante la aclimatización a los 30 d. Los resultados mostraron que el sistema de inmersión temporal con una frecuencia de inmersión de 2 min cada 12 h, con un volumen de medio por explante de 50 mL y un suministro aire de 2 min cada 12 h obtuvo los mejores parámetros de desarrollo, con 29.60 brotes por explante, una longitud promedio de brotes de 2.01 cm, así como un porcentaje de hiperhidricidad del 3.33 %. En conclusión, el SIT utilizado en este estudio es una alternativa para la micropropagación comercial de *A. potatorum*.

**Palabras clave:** Inmersión temporal, frecuencia de inmersión, volumen de medio, suministro de aire, hiperhidricidad, aclimatización.

*IN VITRO* MULTIPLICATION OF AGAVE TOBALA (*Agave potatorum* Zucc.) USING A  
TEMPORARY IMMERSION SYSTEM

Lorena Correa Hernández, M. C.

Colegio de postgraduados, 2021.

Agave tobala (*Agave potatorum* Zucc.) is important for the production of an alcoholic beverage called mescal. The objective of this study was to develop a protocol for the commercial micropropagation of *A. potatorum* using a temporary immersion system (TIS). Different culture conditions were evaluated in temporary immersion using an ebb-and-flow bioreactor and semisolid medium as control treatment at multiplication stage. In temporary immersion, different immersion frequencies (2 min each 4, 8, 12 and 16 h), medium volume per explant (100, 75, 50 and 25 mL) and additional air supply (2 min each 4, 8, 12 and 16 h) were evaluated. In all experiments, the percentage of hyperhydricity, number and length of shoots per explant and total chlorophyll content were evaluated at 60 d of culture. In addition, the survival rate during acclimatization was evaluated at 30 d. The results show that the temporary immersion system with an immersion frequency of 2 min every 12 h, with a culture medium volume of 50 mL and an air supply of 2 min every 12 h obtained the best development parameters, with 29.60 shoots per explant, an average shoot length of 2.01 cm, and a percentage of hyperhydricity of 3.33 %. In conclusion, the TIS used in this study is an alternative for the commercial micropropagation of *A. potatorum*.

**Key words:** Temporary immersion, immersion frequency, volume of culture, air supply, hyperhydricity, acclimatization.

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>2</b>
2.1. Generalidades del agave.....	2
2. 1. 1. Importancia del Agave.....	3
2. 2. <i>Agave potatorum</i> Zucc.....	5
2. 3. Cultivo de tejidos vegetales.....	7
2. 3. 1. Principios básicos.....	8
2. 3. 2. Micropropagación.....	9
2. 3. 3. Sistemas de Inmersión Temporal (SIT).....	12
2. 3. 4. Biorreactores de flujo y reflujo.....	13
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
4. 2. Objetivo General.....	16
4. 3. Objetivos específicos.....	16
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>16</b>
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
6. 1. Ubicación del área de trabajo.....	17
6. 2. Estrategia experimental.....	17
6. 3. Material vegetal y establecimiento <i>in vitro</i> .....	18
6. 4. Multiplicación.....	18
6. 5. Evaluación de diferentes sistemas de cultivo.....	19

6. 6. Evaluación de la frecuencia de inmersión.....	19
6. 7. Evaluación de volumen de medio por explante.....	20
6. 8. Evaluación de suministro de aire.....	20
6. 9. Contenido de clorofila.....	20
6. 10. Aclimatización.....	21
6. 11. Diseño experimental y análisis de datos.....	21
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
7. 1. Evaluación de diferentes sistemas de cultivo.....	22
7. 2. Evaluación de diferentes frecuencias de inmersión.....	23
7. 3. Volumen de medio por explante.....	24
7. 4. Evaluación de suministro de aire.....	25
7. 5. Contenido de clorofila.....	25
7. 6. Aclimatización.....	28
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>28</b>
8. 1. Evaluación de diferentes sistemas de cultivo.....	28
8. 2. Evaluación de diferentes frecuencias de inmersión.....	30
8. 3. Evaluación del volumen de medio de cultivo por explante.....	30
8. 4. Evaluación de suministro de aire.....	31
8. 5. Contenido de clorofila.....	32
8. 6. Aclimatización.....	33
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>34</b>
<b>10. REFERENCIAS.....</b>	<b>35</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Fig 1.</b> <i>Agave potatorum</i> Zucc. en habitat natural.....	5
<b>Fig. 2.</b> Plantación natural de agaves en la comunidad San Diego la Mesa, Atlixco, Puebla.....	6
<b>Fig. 3.</b> Esquema general de la micropropagación.....	10
<b>Fig. 4.</b> Principio básico del Sistema flujo y reflujo.....	14
<b>Fig. 5.</b> Estrategia experimental.....	17
<b>Fig. 6.</b> Efecto de los diferentes sistemas y tiempos de inmersión en la hiperhidricidad a los 60 días de cultivo en <i>A. potatorum</i> .....	23
<b>Fig. 7.</b> Efecto de diferentes sistemas de cultivo sobre la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>A. potatorum</i> Zucc. a los 60 d de cultivo.....	26
<b>Fig. 8.</b> Contenido total de clorofila durante la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>A. potatorum</i> a los 60 días de cultivo.....	27
<b>Fig. 9.</b> Plantas micropropagadas de <i>Agave potatorum</i> obtenidas de los diferentes tratamientos a los a) 30 y b) 90 días de aclimatización bajo condiciones de invernadero.....	28

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Efecto del sistema de cultivo, frecuencias de inmersión, volumen de medio por explante y suministro de aire en la multiplicación y aclimatización de <i>Agave potatorum</i> Zucc.....	22
---	----

## ABREVIATURAS

**AIA:** Ácido indolacético

**ANDEVA:** Análisis de varianza

**BAP:** Bencilaminopurina

**BIT:** Biorreactor de Inmersión Temporal

**BIG:** Biorreactor de Inmersión por Gravedad

**BIOMINT:** Biorreactor modular de inmersión temporal

**CAM:** Metabolismo ácido de las crasuláceas

**CTV:** Cultivo de Tejidos Vegetales

**ES:** Error estándar

**IT:** Inmersión Temporal

**RITA:** Recipiente de Inmersión Temporal Automatizada

**SA:** Suministro de aire

**SIT:** Sistemas de Inmersión Temporal

## 1. INTRODUCCIÓN

El agave tobalá (*Agave potatorum* Zucc) es una especie silvestre utilizada en México para la producción de una bebida alcohólica tradicional llamada mezcal (Félix-Valdez *et al.*, 2016). *A. potatorum* presenta escasa o nula formación de hijuelos para su reproducción asexual como otras especies de la familia Asparagaceae, por lo que dependen de la producción de semillas (Delgado-Lemus *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2015 y Félix-Valdez *et al.*, 2016). Sin embargo, este método de propagación no garantiza la calidad genética y fitosanitaria de genotipos seleccionados. Como resultado al incremento del interés comercial en la industria del mezcal, se ha reportado una reducción sustancial regional de las poblaciones de agaves silvestres debido al mal proceso de planeación para cosecha (Delgado-Lemus *et al.*, 2014a), lo que puede modificar los niveles y la distribución de la diversidad genética (Sebbenn *et al.*, 2008). Esta situación ha llevado a buscar estrategias para la producción de agaves silvestres por lo cual la micropropagación de agave es una alternativa viable para la conservación y multiplicación *in vitro* de esta especie (Monja-Mio *et al.*, 2019).

A pesar de las ventajas que ofrece la micropropagación convencional en medio semisólido, esta implica altos costos de producción causados por la mano de obra, el uso de agentes gelificantes y dificulta la semiautomatización de la micropropagación (Etienne y Berthouly, 2002; Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2019). En este sentido, el uso de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) reducen los costos de la micropropagación utilizando biorreactores semiautomatizados diseñados para la propagación masiva de explantes expuestos a un volumen de medio líquido, con tiempo y frecuencia de inmersión determinados (Martínez-Estrada *et al.*, 2019). Estos sistemas se han convertido hoy en día en una de las herramientas más utilizadas para la micropropagación

comercial de plantas (Ruta *et al.*, 2020). Además, se ha reportado que los SIT facilitan condiciones fotomixotróficas y promueven procesos fisiológicos como la función estomática y síntesis de clorofila.

La propagación *in vitro* del género *Agave* en medio de cultivo semisólido ha sido ampliamente estudiada en especies como *Agave sisalana* (Nikam *et al.*, 2003), *Agave tequilana* Weber (Rodríguez-Sahagún *et al.*, 2011), *Agave fourcroydes* Lem (Monja-Mio y Robert, 2013), *Agave americana* (Lecona-Guzmán *et al.*, 2017), *Agave angustifolia* (Ríos-Ramírez *et al.*, 2018) y *Agave angustifolia* albino (Sara *et al.*, 2020) y en inmersión temporal en *Agave tequilana* (Monja-Mio *et al.*, 2020). Sin embargo, el uso de SIT para la micropropagación de *A. potatorum* no ha sido ampliamente estudiada, por lo tanto, el objetivo del presente trabajo es desarrollar un protocolo para la micropropagación comercial de *A. potatorum* utilizando un sistema de inmersión temporal.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades del agave

México es considerado el centro de origen y diversidad de los agaves, ya que de 210 especies cuenta con el 75 %, de las cuales 57 % son endémicas. Son plantas perennes, monocárpicas, y alcanzan la madurez sexual a partir de los 5 a 25 años, dependiendo de la especie y del ambiente en el que se reproduce (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007).

Los agaves son plantas xerófitas de la familia Asparagaceae, están adaptadas para vivir en condiciones climáticas desfavorables con largos periodos de sequía y altas temperaturas. Su morfología es causa de la adaptación ambiental. Algunas de sus adaptaciones han sido la succulencia en hojas, la cual ayuda a la planta a mantenerse viva en tiempos de sequía. Así mismo,

el sistema radicular es superficial, lo que facilita la absorción del agua. Gracias a las fibras existentes en las hojas, los tejidos mantienen su forma en los periodos largos de sequía que pueden durar hasta 7 años (Gentry, 1982). Los agaves cuentan con metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), caracterizado por fijar CO<sub>2</sub> por las noches, donde al abrir los estomas y realizar la evapotranspiración tienen una pérdida de agua mínima (Langlé-Argüello *et al.*, 2019).

La reproducción de los agaves puede ser sexual o asexual. En la reproducción sexual, la planta genera un escapo o quiote, donde se desarrolla la inflorescencia y posteriormente produce semillas. Esta es causada por la polinización efectuada principalmente por murciélagos nectarívoros y algunos insectos diurnos (Trejo-Salazar *et al.*, 2016). La reproducción asexual, consiste en brotes vegetativos denominados hijuelos, los cuales varían de acuerdo al lugar de la planta que se desarrollan, pueden ser: aéreos, axilares, basales o de rizoma (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007). Las especies de agave han sido utilizadas por los pueblos mexicanos como bebida, alimento, construcción, medicina, cuerdas, ropa, leña entre otros desde hace más de 150 años. Los agaves pueden encontrarse en varios tipos de vegetación en todo México (Gentry, 1982) y se ha reportado que al menos 53 especies son utilizadas para la producción de mezcal (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2015).

### **2. 1. 1. Importancia del agave**

México es el centro de origen del agave y desde la época precolombina, se han desarrollado diferentes tecnologías para obtener sus derivados como alimentos, fibras, y bebidas alcohólicas como Mezcal, Tequila, Bacanora, Raicilla y Pulque (Radding, 2012), lo que llevó al desarrollo de una cultura en torno a los agaves y sus productos. Sin embargo, la industria de las bebidas alcohólicas es la más importante económicamente (Trejo-Salazar *et al.*, 2016).

El mezcal es una bebida espirituosa destilada tradicional, obtenida por fermentación de los azúcares de la planta de agave. Tiene denominación de origen mexicana y es regulada por el Consejo Regulador del Mezcal según la NOM-070-SCFI-2016 Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones (NOM-Mezcal).

Se estima que la destilación intensiva del mezcal inició a mediados del siglo pasado, y se requieren de 6 hasta 20 kg de agave (piña o tallo y base de hojas de la planta adulta) por litro de mezcal producido (Gutiérrez-Hernández *et al.*, 2020).

La mayor parte de los agaves utilizados para la producción de mezcal son plantas silvestres recolectadas justo antes de la reproducción sexual y, en consecuencia, las poblaciones de agave se han reducido significativamente. Algunas especies, entre ellas *Agave potatorum* Zucc. se consideran en riesgo, debido a su extracción para la producción de mezcal (Delgado-Lemus *et al.*, 2014a) sin embargo esto no se encuentra reportado en la mayor parte de los agaves silvestres por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.

Muchas especies de agave se utilizan para la elaboración de mezcal, dependiendo de la región mexicana, algunas de estas especies de agave son: *Agave angustifolia*, *A. tequilana*, *A. cupreata*, *A. karwinskii*, *A. durangensis*, *A. potatorum* y *A. marmorata*, entre otros (Martínez *et al.*, 2019).

En algunas comunidades rurales, las personas pueden extraer del 54 al 87 % de todas las plantas reproductivas por año en sus territorios, y en algunas comunidades se extraen de manera aún más intensiva llevándolas a la extinción en la zona (Delgado-Lemus *et al.*, 2014a). Por ello, surge la necesidad de desarrollar programas de manejo integral de este recurso.

## 2. 2. *Agave potatorum* Zucc.

*Agave potatorum*, nombre proveniente del latín *potator*, *-oris*, bebedor (de vino), también llamado tobalá, papalometl o papalomé. Fue descrita por Joseph Gerhard Zuccarini en 1832. En estos tiempos no se conocía la procedencia de la especie; sin embargo, Gentry (2004) reunió bajo *Agave potatorum* a un número altamente variable de plantas en los estados de Oaxaca y Puebla.

La especie *A. potatorum* la conforman plantas polimórficas no surculosas, las rosetas en comparación con otras especies de la misma familia son pequeñas, acaulescentes, con 50 – 80 hojas de color blanzuzco a verde de forma ovada a lanceolada con espinas prominente de 5 -10 mm de longitud (Fig. 1). Las inflorescencias suelen medir de 3 - 6 m de alto y los racimos producen de 15 – 30 flores de color verde amarillento, que producen cápsulas ovoides de 4 – 5 x 5 cm. Las semillas son negras, brillantes en forma de gota con un tamaño de 7 x 6 mm. La floración se da en otoño de septiembre a diciembre.



**Figura 1.** *Agave potatorum* Zucc. en habitat natural. a) Planta completa, b) Forma de las espinas de *A. potatorum*.



El hábitat del *A. potatorum* es semiárido, con altitudes de 1240 - 2400 m y se pueden encontrar en laderas cubiertas de hierba en poblaciones dispersas (Fig. 2) que son cada vez más reducidas por el pobre manejo sustentable de la especie (Rangel-Landa *et al.*, 2015).



**Figura 2.** Plantación natural de agaves en la comunidad San Diego la Mesa, Atlixco, Puebla.

Plantas de *A. potatorum* son cultivadas en tierras marginales de la Mixteca baja de Oaxaca y por su concentración de azúcares es considerada una especie estratégica para el cultivo comercial en las condiciones edafoclimáticas de la región. El agave tobalá a diferencia de la mayoría de los agaves, su propagación asexual es casi nula y depende de las semillas para sobrevivir (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013; Delgado-Lemus *et al.*, 2014b). Para el mantenimiento de las poblaciones de *A. potatorum*, se requiere ayudar a la recuperación de las poblaciones silvestres, mejorando el

proceso de producción y colecta de plántulas *in situ*, así como produciendo y manteniendo plantas en viveros, para su reincorporación en sistemas agroforestales tradicionales (Moreno-Calles y Casas, 2010; Torres *et al.*, 2015). Por lo tanto, se necesita información sobre factores y mecanismos relacionados con el establecimiento de plantaciones de agave para desarrollar técnicas adecuadas de recuperación y uso sostenible de sus poblaciones. Una alternativa para la conservación y propagación de esta especie es media te técnica de Cultivo de Tejidos Vegetales.

### **2. 3. Cultivo de Tejidos Vegetales**

Se le llama Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) al conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, axénicas y controladas (Phillips y Garda, 2019).

Las técnicas de cultivo de tejidos resultan atractivas para la propagación de especies amenazadas, debido a las altas tasas de multiplicación que se obtienen y al reducido material de partida requerido, entre las más utilizadas se encuentra la micropropagación *in vitro*. Está basado en la teoría de la totipotencia celular, que se define como la capacidad de una sola célula para dividirse y producir todas las células diferenciadas de un organismo, incluidos los tejidos extraembrionarios (Mitalipov y Wolf, 2009).

Existen dos principales vías para la regeneración de plantas *in vitro*: la embriogénesis somática y la organogénesis. La organogénesis, se refiere a la producción de órganos vegetales como raíces o brotes y la embriogénesis somática que consiste en la formación de embriones a partir de células somáticas (Molphe *et al.*, 1999). Tanto la organogénesis como la embriogénesis somática se producen directamente a partir de los tejidos parentales o indirectamente a través de la formación

de un callo, y están principalmente influenciadas por el tipo de explante y la señalización del regulador del crecimiento de la planta (Loyola y Ochoa, 2018). Los cultivos resultantes pueden usarse posteriormente para la producción masiva de plantas (micropropagación) (Espinosa-Leal *et al.*, 2018). El CTV se basa en tres principios básicos, del cual dependen el éxito o fracaso de cualquier trabajo.

### **2. 3. 1. Principios básicos**

- Elección del explante. El explante es cualquier órgano, tejido, semilla o segmento de tejido vegetal que se utilizará para iniciar el cultivo. En teoría, cualquier segmento de tejido vegetal que contenga células vivas puede ser utilizado como explante y su elección es determinante para el tipo de respuesta durante el cultivo. Por regla general, entre más joven y menos diferenciado sea un tejido, más fácil será su adaptación y respuesta al cultivo *in vitro*.
- Elección del medio y condiciones de cultivo. A grandes rasgos, el medio de cultivo consiste en dos grupos de componentes. El primer grupo incluye a los nutrientes minerales, la fuente de carbono y algunas vitaminas, que satisfacen los requerimientos nutricionales del tejido cultivado. El segundo grupo es conformado por las fitohormonas o reguladores del crecimiento vegetal. Determinan en gran medida el tipo de respuesta que se obtendrá de éste, y por lo tanto influyen en el éxito o fracaso del establecimiento y repuesta de los cultivos *in vitro*.
- Condiciones asépticas. Para obtener éxito en el cultivo de cualquier tejido vegetal, es necesario excluir cualquier tipo de organismo contaminante. Por esta razón es necesario esterilizar el medio de cultivo y el instrumento a utilizar.

El Cultivo de Tejidos Vegetales es la mejor opción para el mejoramiento de la producción de agaves para propósitos comerciales, ya que contribuye a la conservación de especies en peligro y la oportunidad de conservarlas para futuras investigaciones (Monja-Mio *et al.*, 2019). Una de las aplicaciones comerciales más utilizada del cultivo de tejidos es la micropropagación o propagación clonal *in vitro*.

### **2. 3. 2. Micropropagación**

Se le llama micropropagación a la producción asexual de plantas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*. Esta es la aplicación más utilizada a nivel comercial de la biotecnología vegetal debido a su productividad en comparación con técnicas tradicionales de propagación de plantas (Molphe *et al.*, 1999). La micropropagación consta de cinco etapas para cualquier cultivo:

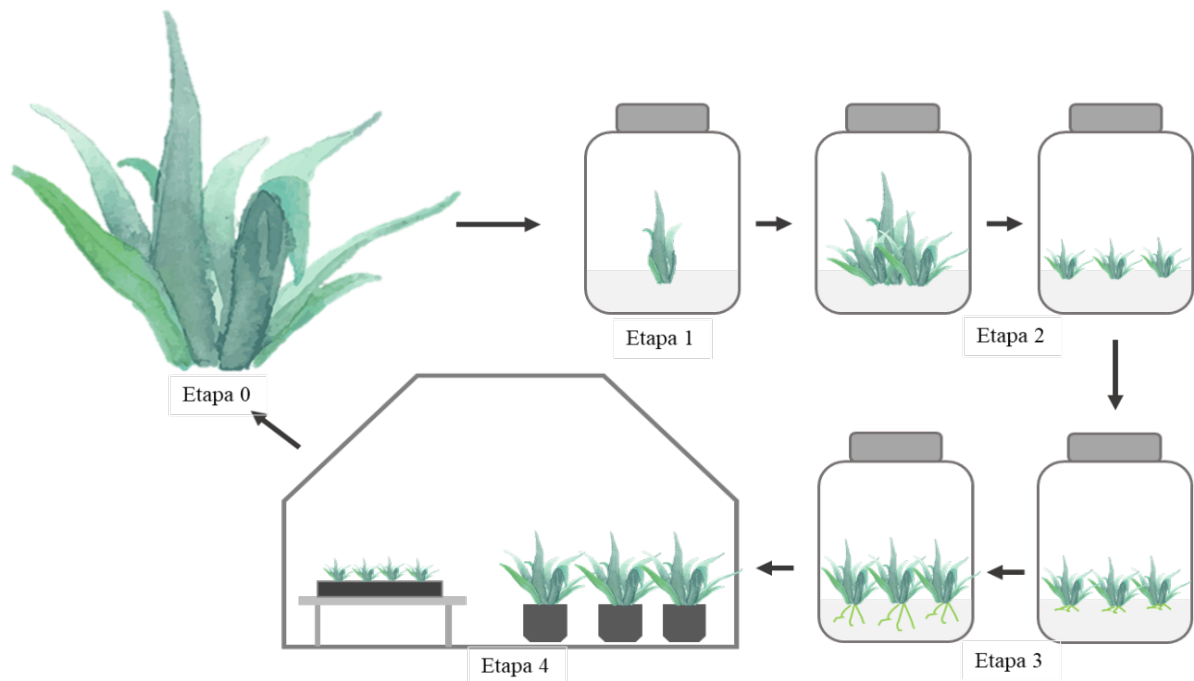
Etapa 0. Selección de plantas madre: en esta fase se eligen plantas denominadas élite ya que al ser un sistema de propagación clonal estas garantizan que todas las plantas generadas compartan el mismo material genético. Aunque muchas veces no se le toma importancia, es parte fundamental del éxito de la etapa 1 pues además de la selección, se le da un pre tratamiento para desinfectar las plantas.

Etapa 1. Establecimiento: aquí se realiza la elección del tipo de explante y su posterior esterilización. La elección del explante depende de lo que se quiera generar en la etapa 2. El porcentaje de éxito en la etapa de establecimiento suele ser bajo por los problemas de adaptación y contaminantes que la planta puede presentar, sin embargo, es muy poco el material vegetal que se necesita para iniciar la siguiente etapa.

Etapa 2. Multiplicación *in vitro* del tejido: en la multiplicación, se obtienen nuevos brotes a partir de una cantidad pequeña de tejido vegetal. La multiplicación puede ser dada a través de la organogénesis, la embriogénesis somática y la multiplicación por yemas.

Etapa 3. Elongación y enraizamiento: en esta etapa se pretende que los brotes generados en la multiplicación crezcan y desarrollen un sistema radical para hacer más fácil su manejo y adaptación a un ambiente *ex vitro*.

Etapa 4. Aclimatización: las plantas micropropagadas *in vitro* al crecer en ambientes controlados con alta humedad relativa y una fuente de carbono externa tienen una fisiología diferente a plantas desarrolladas en campo abierto, debido a que las plantas *in vitro* no tienen un control sobre su transpiración, así mismo, no realizan fotosíntesis por lo que su adaptación *ex vitro* debe ser controlada dentro de un invernadero con poca intensidad lumínica, una disminución gradual de la humedad, así como el control de plagas y enfermedades. En la Figura 3 se muestran las etapas de la micropropagación.



**Figura 3.** Esquema general de la micropropagación.

Algunas de las ventajas que ofrece la micropropagación son las siguientes:

- Se define como un sistema clonal, lo que significa que las plantas micropropagadas tienen el mismo material genético que las plantas iniciadoras.
- Es un sistema independiente a condiciones externas, por lo cual no es afectado por el clima.
- Se puede obtener un número ilimitado de plantas.
- Produce plantas de calidad libres de plagas y enfermedades.

Entre las desventajas de la micropropagación se encuentra el costo inicial de laboratorio e insumos, por lo cual se han buscado nuevas formas de producción que permitan hacer más eficiente el proceso, además la escasa supervivencia de las plántulas en ambientes *ex vitro*. Este problema se origina por un mal control de la pérdida de agua provocada por la alta humedad relativa *in vitro* y por un pobre desarrollo de la fotosíntesis. Lo que se ha atribuido a la presencia de azúcar en el medio, a la escasa iluminación y al inadecuado suministro de CO<sub>2</sub> (Kozai y Iwanami, 1988).

La micropropagación convencional requiere realizar subcultivos cada 30 o 60 días debido a la disminución de nutrientes en el medio, además de la producción y crecimiento de brotes que se ve limitada por el tamaño de los contenedores. Así mismo, el manejo de grandes cantidades de frascos para almacenar los cultivos suelen tomar la mayor parte del tiempo en el proceso de micropropagación por lo que se han buscado alternativas al cultivo convencional (Etienne y Berthouly, 2002).

El medio líquido ha sido utilizado como una alternativa para la reducción de costos y es viable para la automatización del proceso. Así mismo, se ha reportado que el medio líquido provee mayor uniformidad en las condiciones de cultivo (Maene y Debergh, 1985). Sin embargo, el medio líquido puede causar asfixia e hiperhidratación (Etienne y Berthouly, 2002). Para resolver estos problemas, se han desarrollado algunos sistemas que contienen soportes como esponjas o redes

plásticas que separan el material vegetal del medio líquido, otra alternativa es la Inmersión Temporal, la cual ha sido ampliamente utilizada en la micropropagación con medio líquido.

### **2. 3. 3. Sistemas de Inmersión Temporal**

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) semi-automatizan el proceso de micropropagación permitiendo un contacto intermitente y de corta duración del explante con el medio líquido el cual renueva la atmósfera y da una cantidad de nutrientes necesaria; al no utilizar gelificantes, reducen el costo y tiempo de producción, además, los explantes tienen mayor contacto con el medio externo, por las corrientes de aire que se utilizan en los SIT (Ramírez-Mosqueda y Iglesias-Andreu, 2016, Arano-Avalos *et al.*, 2020).

Los SIT emplean biorreactores especialmente diseñados para propósitos de micropropagación a escala. Estos sistemas están diseñados para proporcionar un ambiente óptimo, lograr una mejor utilización de los nutrientes e intercambio de gases, y lograr un bajo estrés mecánico con el fin de reducir los trastornos fisiológicos y preservar la integridad morfológica de la planta en cultivos *in vitro* (Georgiev *et al.*, 2014). El uso eficiente de los SIT deben establecer las condiciones óptimas de cada una de las fases de micropropagación que se llevarán a cabo en el biorreactor, lo que incluye el tiempo de inmersión, volumen de medio, volumen del recipiente y la ventilación forzada, que dependerán de las características del biorreactor, así como del tipo de explante y especie vegetal a utilizar (Ducos *et al.*, 2007). Un diseño apropiado puede ser económico, rápido y eficiente para generar plantas de calidad en un corto tiempo.

El tiempo de inmersión es el parámetro más importante para la eficiencia de los SIT y depende del tipo de biorreactor y la especie a utilizar. Este parámetro determina la absorción de nutrientes y la exposición a reguladores del crecimiento, afectando la producción y calidad de los embriones. La

absorción de nutrientes es dada por la película de medio que se retiene en los tejidos vegetales por capilaridad entre ciclos de inmersión (Etienne and Berthouly, 2002; Berthouly and Etienne, 2005). Desde el primer Biorreactor de Inmersión Temporal descrito por Harris y Mason (1983) han surgido diferentes modelos. Algunos de los biorreactores más utilizados son los Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) (Escalona *et al.*, 1999), Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®) (Teisson y Alvard, 1995), SETIS™ (Vervit, Belgium, NL), PLANTFORM™ (Plant Form AB, Sweden y TC propagation Ltd., IE), Biorreactor Modular de Inmersión Temporal (BioMINT™) (Robert *et al.*, 2006) y el biorreactor de flujo y eflujo (Tisserat y Vandercook, 1985), también conocido como Biorreactor de Inmersión por Gravedad (BIG); sin embargo el costo de algunos biorreactores es elevado, por lo que biorreactores como frascos gemelos o flujo y reflujo son mayormente empleados en la micropropagación ya que muestran ventajas en reducción de costos, aumentan la capacidad de almacenamiento y son de manejo fácil (Leyva-Ovalle *et al.*, 2020).

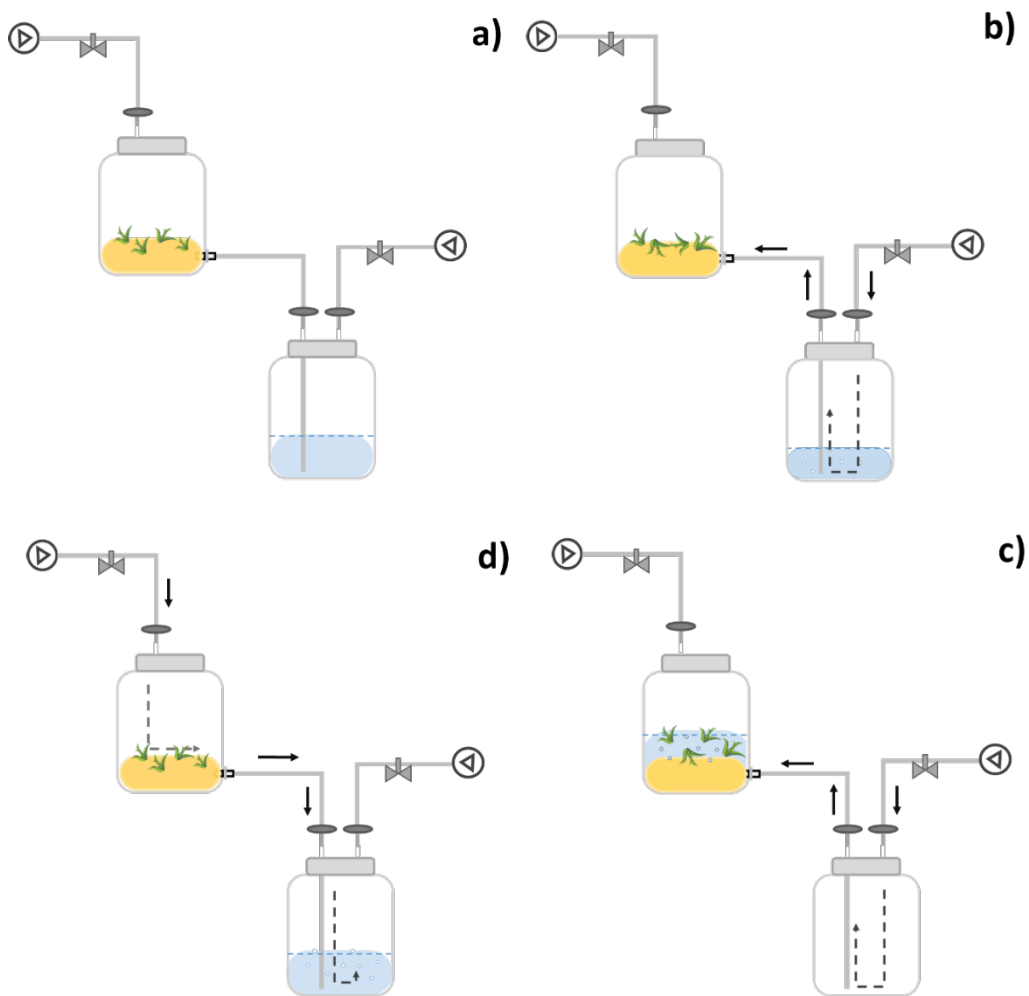
#### **2. 3. 4. Sistemas flujo y reflujo**

El principio de los sistemas flujo y reflujo fue descrito por Tisserat y Vandercook (1985), sin embargo su estructura ha sido modificada. En general consta de dos contenedores contrapuestos conectados de manera externa, uno que contiene el medio de cultivo y el segundo que contendrá un soporte de poliuretano para los explantes. El soporte de poliuretano mantiene suficiente humedad (85 % a 90 %) durante la exposición. El sistema funciona por una diferencia de presiones que entra dentro del frasco que contiene el medio, el medio gracias a la presión, sube al frasco que contiene los explantes por un tiempo determinado y regresa a su origen por gravedad (Fig. 4) (Georgiev *et al.*, 2014). Se ha reportado el uso de estos sistemas para cultivos como papa (*Solanum*



*tuberosum* L) (Cournac *et al.*, 1991), ajo (*Allium sativum* L) (Kim *et al.*, 2004) y anturio (*Anthurium andreaeanum* Lind) (Martínez-Estrada *et al.*, 2019) entre otros.

Las ventajas de los sistemas de flujo y reflujo son la construcción simple, automatización simplificada y menor consumo de energía. La distribución de luz no uniforme dentro del recipiente de cultivo y la falta de opciones para ventilación forzada y enriquecimiento de CO<sub>2</sub> son entre las principales desventajas del sistema. Sin embargo, ha demostrado ser funcional para diferentes especies.



**Figura 4.** Principio básico del Sistema de flujo y reflujo. a) Fase estacionaria, b) aire comprimido entra al frasco de medio, c) fase de exposición, d) drenado por gravedad.

### 3. JUSTIFICACIÓN

El consumo de productos artesanales ha tomado gran fuerza en los últimos años, en el caso del mezcal la materia prima son los agaves silvestres los cuales presentan una tasa de reproducción muy baja (Delgado-Lemus *et al.*, 2014b). Entre las especies silvestres más utilizadas en el sureste de México se encuentran el *Agave potatorum* Zucc. (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013). Los agaves silvestres tienen la característica de propagarse sólo de forma sexual; sin embargo, la producción de mezcal demanda cosechar las piñas antes de la floración perturbando el ciclo reproductivo.

El saqueo desmedido de especies silvestres tiene como consecuencia una reducción del tamaño efectivo de la población, esto puede modificar los niveles y la distribución de la diversidad genética (Sebbenn *et al.*, 2008). La alta demanda de materia prima para las industrias ha llevado a la búsqueda de nuevos métodos de producción.

Las plantaciones de agave utilizadas para la producción industrial han tenido un realce reciente en la micropropagación dando como resultado colaboraciones entre industrias e instituciones de investigación con el propósito de rescatar las variedades posibles.

Existen varios reportes de protocolos para la producción *in vitro* de diferentes especies de agave en condiciones de medio semisólido, sin embargo, no todos los protocolos se pueden utilizar para una producción a gran escala, además de que hoy en día se buscan sistemas de producción cada vez más eficientes. Por lo cual en este documento se pretende desarrollar un sistema que nos permita producir de manera eficiente plantas de *Agave potatorum* con calidad comercial.

## 4. OBJETIVOS

### 4. 2. Objetivo General

Establecer un protocolo en biorreactores de flujo y reflujo para la micropropagación de agave (*Agave potatorum* Zucc.).

### 4. 3. Objetivos específicos

- Evaluar los sistemas de cultivo en medio semisólido y medio líquido en inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de *Agave potatorum* Zucc.
- Evaluar el efecto de diferentes frecuencias de inmersión (2 min cada 4, 8, 12 y 16 h) sobre la multiplicación *in vitro* de *A. potatorum* en inmersión temporal.
- Determinar el volumen de medio de cultivo por explante (25, 50, 100 mL) en la multiplicación *in vitro* en inmersión temporal.
- Determinar la frecuencia de suministro de aire (2 min cada 4, 8, 12 y 16 h) para reducir la hiperhidricidad durante la multiplicación *in vitro* en inmersión temporal.
- Determinar el contenido de clorofila de los brotes *in vitro* en los diferentes sistemas de cultivo.
- Evaluar el porcentaje de supervivencia en todos los sistemas de cultivo *in vitro* durante la aclimatización en invernadero de *A. potatorum*.

## 5. HIPÓTESIS

El uso de Sistemas de Inmersión Temporal podría incrementar al doble la producción de brotes en la etapa de multiplicación en comparación con medio semisólido para el cultivo de *A. potatorum*, lo que nos permitirá establecer un sistema eficiente para la micropropagación comercial de esta especie.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6. 1. Ubicación del área de trabajo

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Colegio de Postgraduados campus Córdoba, ubicado en la carretera Córdoba - Veracruz Km. 348.5, Venta Parada 11, 94500 Córdoba, Ver.

### 6. 2. Estrategia experimental

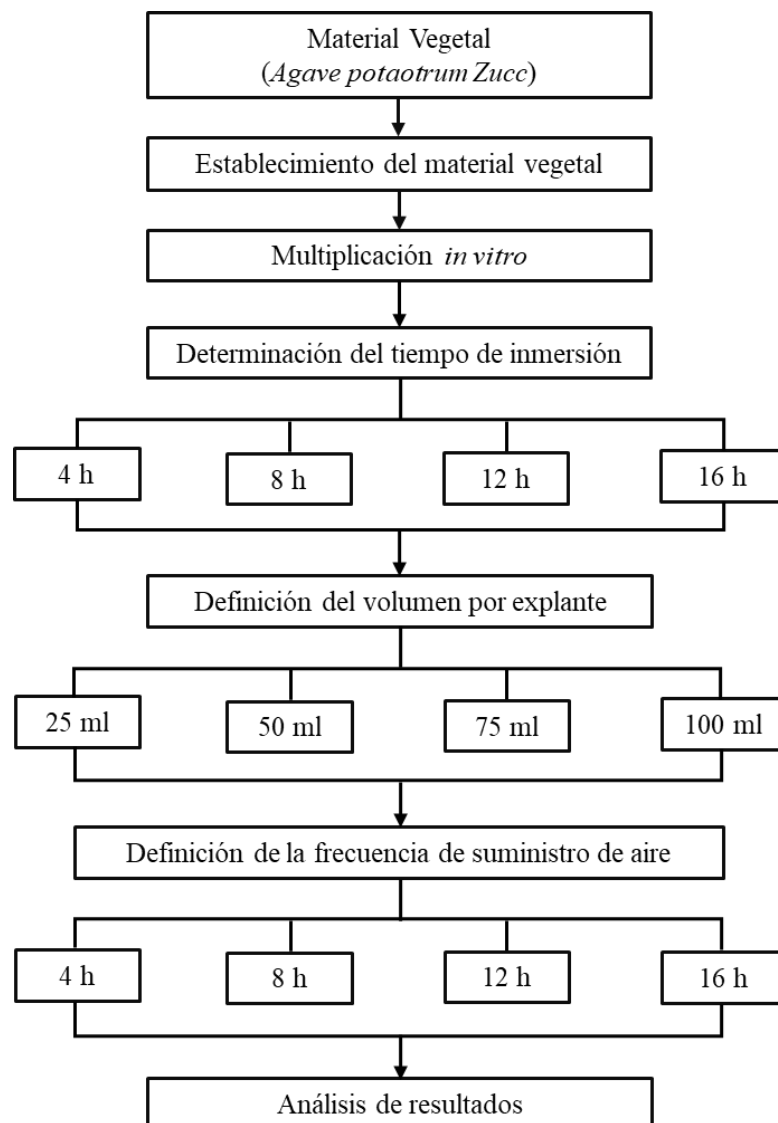


Figura 5. Estrategia experimental.

### **6. 3. Material vegetal y establecimiento *in vitro***

Se recolectaron plantas de agave (*Agave potatorum* Zucc) de aproximadamente 1 año de edad en la comunidad San Diego la Mesa, Puebla, México. Las plantas fueron despojadas de las hojas desarrolladas y se les cortó el extremo basal y apical hasta quedar con el tallo. Los tallos fueron lavados con agua y jabón y transferidos al laboratorio, donde fueron inmersas en una solución jabonosa con dos gotas Tween 20 cada 100 mL por 5 minutos seguido de 5 enjuagues con agua destilada, después se sumergieron en etanol al 70 % por 3 minutos. Los tallos se trasladaron al cuarto de siembra y dentro de una campana de flujo laminar se sumergieron a una solución al 15 % (v/v) de cloro comercial Cloralex™ (Industrias Alen, S.A. de C.V, Nuevo León, México) (6 % de i.a.) por 15 minutos. Posteriormente, se realizaron dos enjuagues con agua destilada estéril. Finalmente, el meristemo apical fue extraído y cultivado en medio semisólido MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP (6-benzilaminopurina, Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA), 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico y 50 mg L<sup>-1</sup> de cisteína. El medio de cultivo fue ajustado a un pH de 5.8 con 0.1 N de NaOH y agregó 0.55 % (w/v) de Agar (Phytotechnologies laboratorios, KS, USA). El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C y 115 kPa por 15 min. El cultivo fue incubado a 24 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 h luz con lámparas fluorescentes blancas con una irradiancia 40 - 50 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### **6. 4. Multiplicación**

Para la multiplicación se utilizó un medio MS adicionado con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 3 mg L<sup>-1</sup> de AIA además de 0.55 % (w/v) de agar. Fue llevado a un pH de 5.8 para su posterior esterilización. En el caso de los BIG la única diferencia es que el medio no contiene gelificante. El ciclo de multiplicación consta de 30-45 días bajo las condiciones de incubación antes mencionadas

## **6. 5. Evaluación de diferentes sistemas de cultivo**

Después de tres subcultivos (60 días cada uno) en un medio de multiplicación MS con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 3 mg L<sup>-1</sup> de BAP y adicionado con 3 mg L<sup>-1</sup> AIA (ácido indol-3-acético, Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA), los brotes generados en la etapa anterior fueron utilizados como explantes para la evaluación de los sistemas de multiplicación convencional en medio semisólido y medio líquido en biorreactores de flujo y reflujo descrito por Tisserat y Vandercook (1985) con algunas modificaciones. En ambos sistemas se utilizó el medio de multiplicación antes mencionado. Se utilizaron frascos con 1 L de capacidad para ambos sistemas, cada uno con 10 explantes. Los explantes consisten en dos brotes unidos de la base con longitud de 2 cm. Para ambos casos se utilizaron 500 mL de medio de cultivo a razón de 50 mL por explante. El tiempo de inmersión para los BIG fue de 2 min cada 8 h. Para cada sistema se realizaron tres réplicas con las condiciones de incubación descritas anteriormente.

## **6. 6. Evaluación de la frecuencia de inmersión**

Para determinar la frecuencia de inmersión más adecuada en la multiplicación *in vitro* de *A. potato*, se evaluaron las frecuencias cada 4, 8, 12 y 16 h, con un tiempo de inmersión de 2 min. En todos los casos, se adiciono 50 mL de medio líquido por explante, colocando 10 explantes por biorreactor y tres repeticiones por cada frecuencia. El medio de cultivo de multiplicación y las condiciones de incubación fueron las mismas previamente mencionadas.

## **6. 7. Evaluación de volumen de medio por explante**

Después de determinar la frecuencia de inmersión más adecuada para la multiplicación de brotes, se evaluaron los volúmenes 25, 50, 75 y 100 mL por explante, utilizando la frecuencia de inmersión

de 2 min cada 12 h. En todos los tratamientos se utilizaron tres biorreactores con 500 mL de medio con el número correspondiente de brotes. El medio de cultivo líquido de multiplicación y las condiciones de incubación fueron las mismas previamente mencionadas.

### **6. 8. Evaluación de suministro de aire**

Con la finalidad de disminuir el porcentaje de hiperhidricidad en los explantes, se evaluaron diferentes frecuencias de suministros de aire que consistió en un tiempo de ventilación de 2 min cada 4, 8, 12 y 16 h, utilizando siempre la frecuencia de inmersión de 2 min cada 12 h y con volumen de 50 mL de medio de cultivo por explante. El medio de cultivo líquido de multiplicación y las condiciones de incubación fueron las mismas previamente descritas.

### **6. 9. Contenido de clorofila**

Los contenidos de clorofilas a, b y total fueron determinados de acuerdo a la metodología propuesta por Harborne (1973) modificada por Martínez-Estrada *et al.* (2019). Las absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro (Genesys 10S, Thermo Scientific, MA, USA) a 663 nm y 645 para Chl a y b, respectivamente. El contenido de clorofila total fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Clorofila total } (C) = ([8.20 * A_{663} - (20.2 * A_{645})] (V)) / (1000 * W)$$

Donde:

$A_{663}$  y  $A_{645}$ : son las absorbancias

V: graduación de volumen en mL<sup>-1</sup>

W: peso de la muestra en g

1000: factor de conversión

## 6. 10. Aclimatización

Para la aclimatización de plántulas obtenidas *in vitro* se tomaron 100 brotes de aproximadamente 2-3 cm de longitud de diferentes tratamientos. Los brotes fueron sembrados *ex vitro* en charolas de polipropileno 72 cavidades con un sustrato conformado por tierra común, perlita y tezontle (1:1:1). Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero con 60 % sombra a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ , una humedad relativa del 60 % y luz natural a una irradiancia de  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y riego dos veces por días durante 30 días. Posteriormente, las plántulas fueron trasplantadas a charolas de plástico de 38 cavidades con el mismo sustrato mencionado y expuestas a luz natural con una irradiancia de  $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y riego una vez al día por 60 d.

## 6. 11. Diseño experimental y análisis de datos

Todos los experimentos se realizaron con un diseño completamente al azar y replicados tres veces. En todos los tratamientos se evaluó el porcentaje de hiperhidricidad, el número y longitud de brotes por explante. Adicionalmente, se determinó el contenido de clorofilas a los 45 días de cultivo. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) seguido de una prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) mediante el software estadístico SPSS (versión 22 de Windows). Previo al análisis estadístico, los porcentajes de hiperhidratación y sobrevivencia fueron transformados con la fórmula  $Y = \arcsen(\sqrt{x/100})$ , donde  $x$  es el valor del porcentaje. El porcentaje de supervivencia durante la aclimatización fue evaluado a los 30 días.



## 7. RESULTADOS

### 7. 1. Evaluación de diferentes sistemas de cultivo

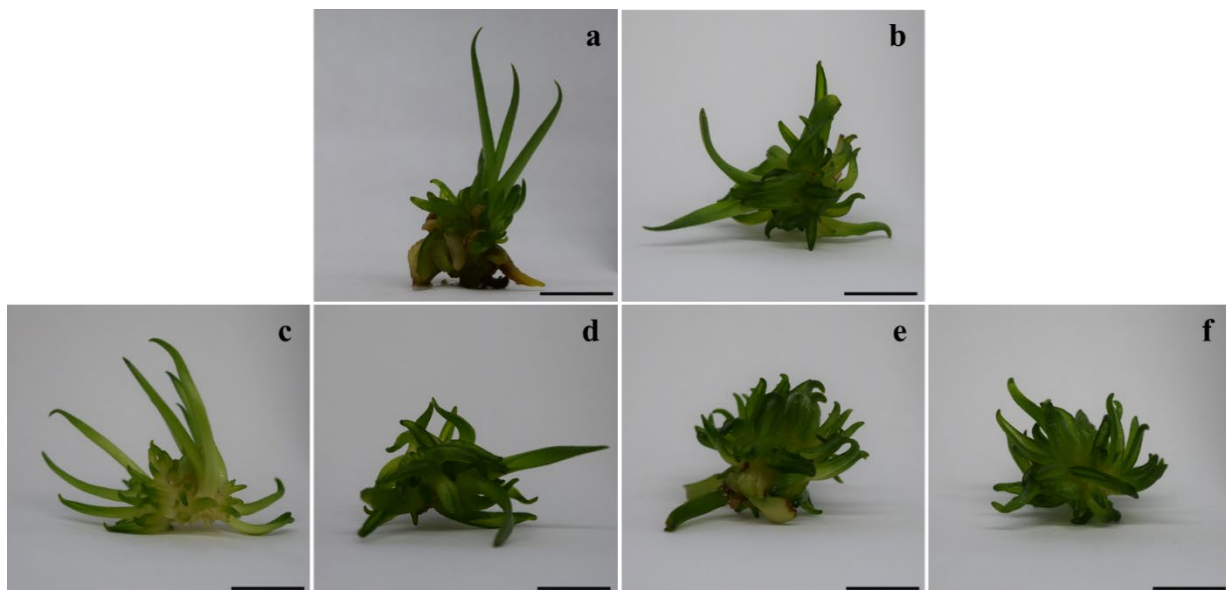
Los resultados muestran diferencias significativas para el porcentaje de hiperhidricidad, número de brotes por explante y longitud de brote durante la multiplicación *in vitro* de *A. potatorum* utilizando diferentes sistemas de cultivo (Tabla 1).

**Tabla 1.** Efecto del sistema de cultivo, frecuencias de inmersión, volumen de medio por explante y suministro de aire en la multiplicación y aclimatización de *Agave potatorum* Zucc.

Tratamientos	Hiperhidricidad (%)	No de brotes por explante	Longitud de brote (cm)	Sobrevivencia (%)
<b>Sistema de cultivo</b>				
Semisólido	12.50 ± 2.50 <sup>bc</sup>	6.27 ± 0.33 <sup>c</sup>	3.39 ± 0.16 <sup>a</sup>	98.00 ± 1.15 <sup>a</sup>
Inmersión Temporal	58.33 ± 4.77 <sup>a</sup>	27.71 ± 2.07 <sup>a</sup>	2.73 ± 0.06 <sup>b</sup>	97.67 ± 1.45 <sup>a</sup>
<b>Frecuencia de inmersión (2 min de inmersión)</b>				
Frecuencia cada 4h	68.3 ± 3.07 <sup>a</sup>	20.44 ± 1.38 <sup>b</sup>	2.47 ± 0.03 <sup>b</sup>	97.33 ± 1.45 <sup>a</sup>
Frecuencia cada 8h	58.33 ± 4.77 <sup>a</sup>	27.71 ± 2.07 <sup>a</sup>	2.73 ± 0.06 <sup>b</sup>	97.67 ± 1.45 <sup>a</sup>
Frecuencia cada 12h	20.00 ± 2.46 <sup>b</sup>	29.76 ± 1.29 <sup>a</sup>	2.71 ± 0.05 <sup>b</sup>	98.33 ± 0.88 <sup>a</sup>
Frecuencia cada 16h	18.00 ± 3.74 <sup>b</sup>	20.59 ± 1.19 <sup>b</sup>	2.09 ± 0.03 <sup>c</sup>	98.33 ± 0.88 <sup>a</sup>
<b>Volumen de medio de cultivo por explante (mL)</b>				
100	23.33 ± 3.33 <sup>b</sup>	30.73 ± 1.26 <sup>a</sup>	2.68 ± 0.05 <sup>b</sup>	98.33 ± 0.88 <sup>a</sup>
75	23.33 ± 3.33 <sup>b</sup>	30.53 ± 1.00 <sup>a</sup>	2.71 ± 0.06 <sup>b</sup>	98.33 ± 0.88 <sup>a</sup>
50	20.00 ± 2.46 <sup>b</sup>	29.71 ± 1.27 <sup>a</sup>	2.71 ± 0.05 <sup>b</sup>	98.00 ± 1.15 <sup>a</sup>
25	17.50 ± 2.50 <sup>b</sup>	19.25 ± 0.91 <sup>b</sup>	2.10 ± 0.04 <sup>c</sup>	98.00 ± 1.15 <sup>a</sup>
<b>Suministro de aire (2 min de suplementación)</b>				
Frecuencia cada 4h	3.33 ± 3.33 <sup>c</sup>	30.53 ± 1.00 <sup>a</sup>	1.68 ± 0.11 <sup>c</sup>	98.67 ± 0.88 <sup>a</sup>
Frecuencia cada 8h	3.33 ± 3.33 <sup>c</sup>	28.08 ± 0.84 <sup>a</sup>	1.88 ± 0.07 <sup>bc</sup>	98.67 ± 0.88 <sup>a</sup>
Frecuencia cada 12h	3.33 ± 3.33 <sup>c</sup>	29.60 ± 0.87 <sup>a</sup>	2.01 ± 0.09 <sup>bc</sup>	98.00 ± 1.15 <sup>a</sup>
Frecuencia cada 16h	6.67 ± 3.33 <sup>bc</sup>	29.73 ± 0.89 <sup>a</sup>	2.51 ± 0.07 <sup>b</sup>	98.00 ± 1.15 <sup>a</sup>

Las medias ± error estándar (ES). Dentro de una columna seguida de diferentes letras entre columnas representan diferencias significativas entre los tratamientos (Tukey  $p \leq 0.05$ )

El menor porcentaje de hiperhidricidad ocurrió en el sistema de cultivo en medio semisólido, con 12.50 %; mientras que en el sistema de cultivo en inmersión temporal se observó 58.33 % (Fig. 6). Respecto al número de brotes por explante, la tasa más alta de multiplicación se obtuvo en inmersión temporal, con 27.71 brotes por explante; mientras que, la tasa más baja de multiplicación se obtuvo en medio semisólido, con 6.27 brotes por explante. Para la variable longitud de brote, los brotes de mayor longitud se obtuvieron en medio semisólido con 3.39 cm; mientras que, la menor longitud de brote se observó en inmersión temporal, con brotes de 2.73 cm de longitud promedio (Fig. 7 a-b).



**Figura 6.** Efecto de los diferentes sistemas y tiempos de inmersión en la hiperhidricidad a los 60 días de cultivo en *A. potatorum*. Sistema semisólido e Inmersión Temporal a) y b) respectivamente. Diferentes frecuencias de inmersión (c-f) cada 4, 8, 12 y 16 h, respectivamente. Barra = 1 cm.

## 7. 2. Evaluación de diferentes frecuencias de inmersión

Respecto a las frecuencias de inmersión se encontraron diferencias significativas entre las variables evaluadas. Los mayores porcentajes de hiperhidricidad se encontraron en las frecuencias

de inmersión cada 4 y 8 h, con 68.3 y 58.33 % de hiperhidricidad, respectivamente; mientras que, los menores porcentajes de hiperhidricidad ocurrieron en las frecuencias cada 12 y 16 h, con 20 y 18 % de hiperhidratación, respectivamente. Respecto al número de brotes por explante, la mayor cantidad de brotes se observó en las frecuencias cada 12 h y 8 h, con 29.76 y 27.71 brotes por explante, respectivamente; mientras que, la menor producción de brotes ocurrió en las frecuencias de inmersión cada 16 y 4 h, con 20.59 y 20.44 brotes por explante, respectivamente. Para longitud de brotes, las frecuencias con mayor longitud de brotes fueron cada 4, 8 y 12 h con 2.47, 2.73 y 2.71 cm respectivamente; mientras que los brotes de menor longitud fueron obtenidos en el tiempo de inmersión cada 16 h, con 2.09 cm de altura (Fig. 7 c-f).

### **7. 3. Volumen de medio por explante**

Al evaluar los diferentes volúmenes de medio de cultivo por explante no se observaron diferencias significativas para el porcentaje de hiperhidricidad. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas para las variables número de brotes y longitud de brote. El mayor número de brotes se observó en los volúmenes de medio de cultivo de 100, 75 y 50 mL, con 30.73, 30.53 y 29.71 brotes por explante, respectivamente. El menor número de brotes se observó con un volumen de medio de 25 mL, con 19.25 brotes por explante. Para la variable longitud de brote, los brotes de mayor longitud de encontraron en el volumen de cultivo de 100, 75 y 50 mL de medio de cultivo por explante, con 2.68, 2.71 y 2.71 cm de longitud, respectivamente. El tratamiento con 25 mL obtuvo menor longitud de brote, con 2.10 cm de altura (Fig. 7 g-j).

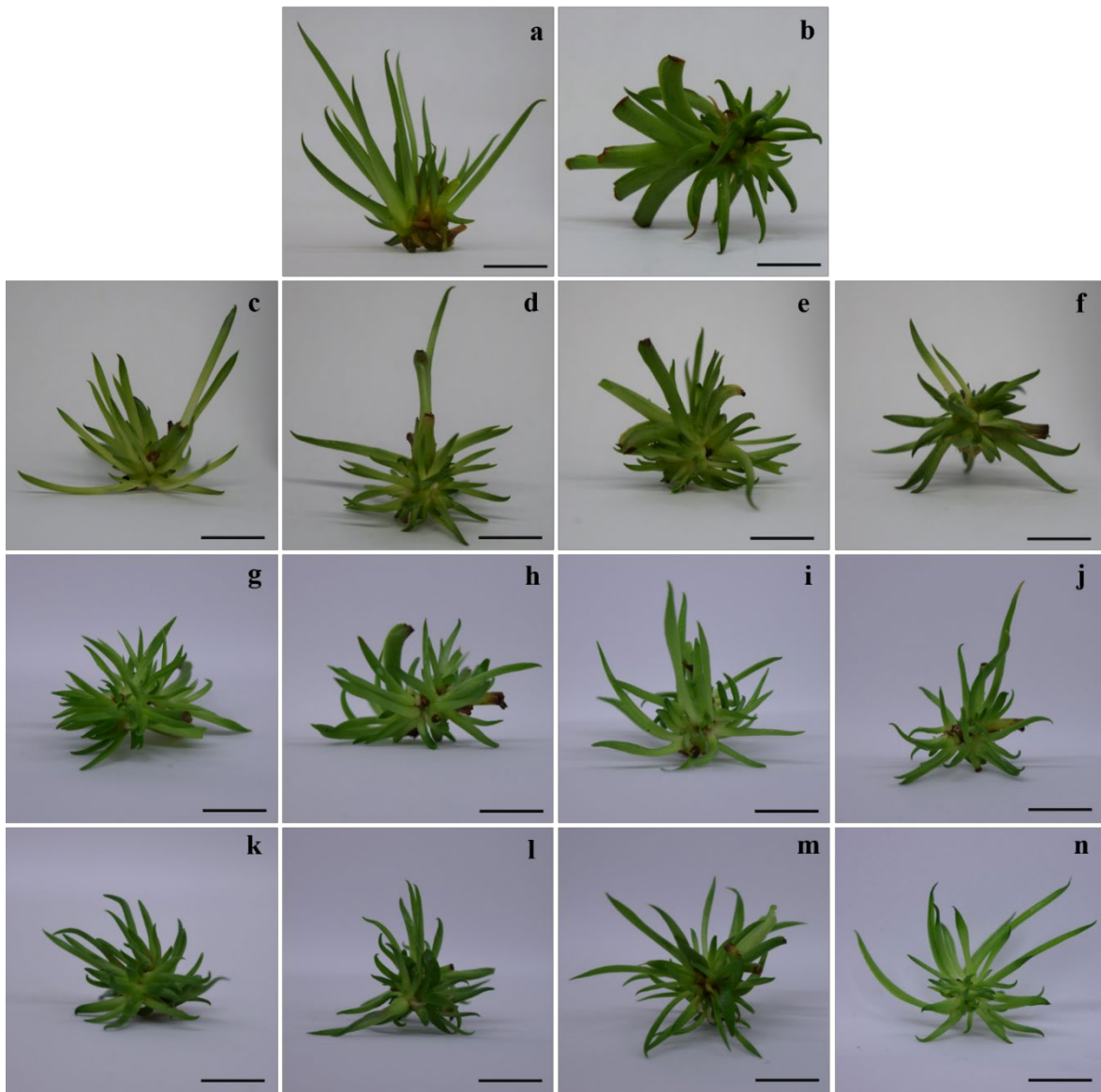
#### **7. 4. Evaluación del suministro de aire**

Los resultados de suministro de aire muestran que en todos los tratamientos hubo una reducción en el porcentaje de brotes hiperhídricos. No se observó diferencia significativa entre las frecuencias de suministro de aire, observándose porcentajes de hiperhidratación entre el 3.33- 6.67 %. Además, tampoco se encontraron diferencias significativas en el número de brotes por explante, obteniendo entre 28-30 brotes por explante en cualquier de los tratamientos de suministro de aire; sin embargo, para la variable longitud de brotes sí hubo diferencias significativas. Los brotes de mayor longitud se observaron en la frecuencia de suministro de aire cada 16 h con 2.51 cm, seguido de la frecuencia 12, 8 y 4 h, con 2.01, 1.88 y 1.68 cm de longitud, respectivamente (Fig. 7 k-n).

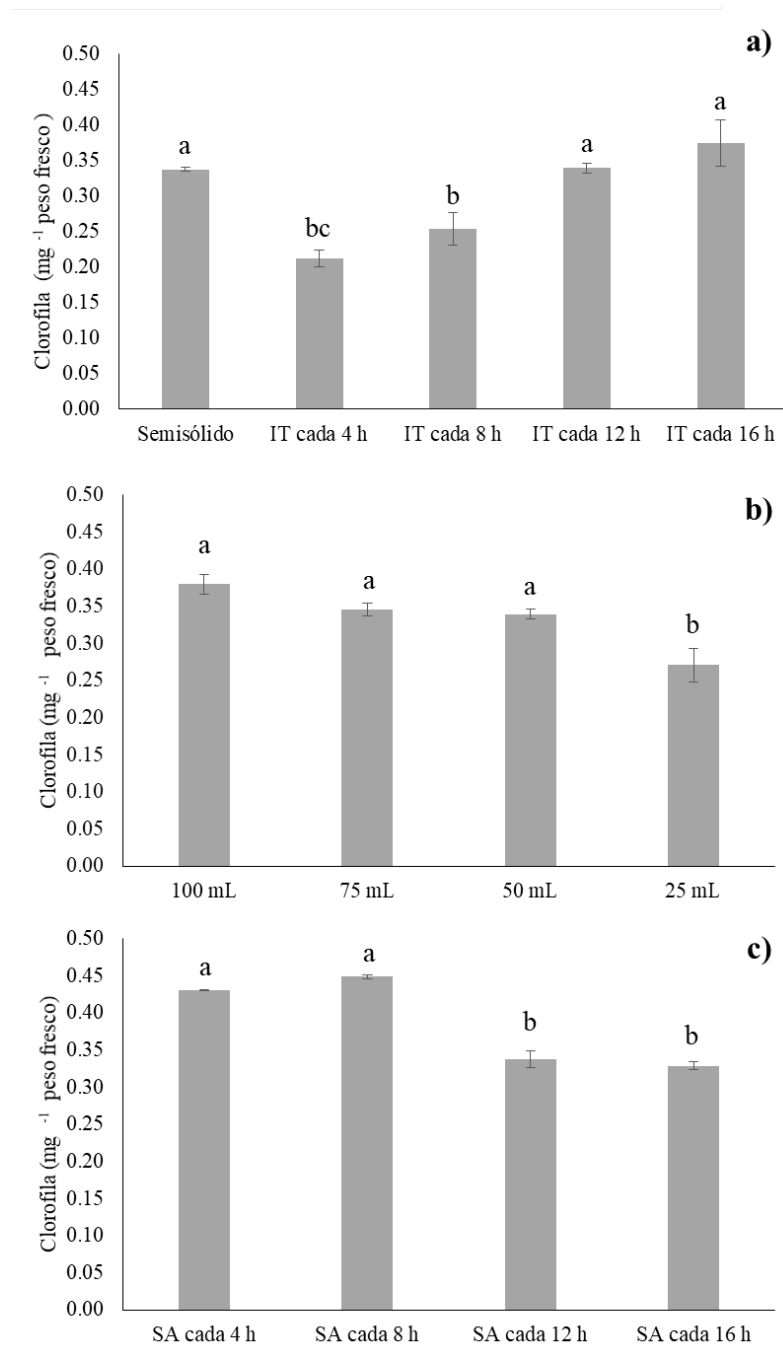
#### **7. 5. Contenido de clorofila**

Los resultados muestran diferencias significativas en el contenido de clorofila total, entre los diferentes sistemas de cultivo evaluados, frecuencias de inmersión, volumen de medio de cultivo y suministro de aire. Para los diferentes sistemas de cultivo evaluados y frecuencias de inmersión, el mayor contenido de clorofila fue obtenido en medio de cultivo semisólido e IT cada 12 y 16 h con 0.340 y 0.375 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente. Seguido de la inmersión cada 4 y 8 h, con 0.212 y 0.253mg g<sup>-1</sup> respectivamente (Fig. 8a). Respecto a volumen de medio por explante, los mayores contenidos de clorofila se encontraron en los volúmenes de 100, 75 y 50 mL por explante, con 0.379, 0.345 y 0.340 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente; mientras que, el menor contenido de clorofila se obtuvo en el tratamiento con 25 mL de medio de cultivo por explante, con 0.271 mg g<sup>-1</sup> (Fig. 8b). Para los suministros de aire, las frecuencias de 8 y 4 h presentaron un mayor contenido de clorofila

con 0.449 y 0.431 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente; mientras que el menor contenido de clorofila se presentó en la frecuencia cada 12 y 16 h con 0.338 y 0.329 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente (Fig. 8c).



**Figura 7.** Efecto de diferentes sistemas de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* de *A. potatorum* Zucc. a los 60 d de cultivo. Sistemas de cultivo: a) semisólido y b) inmersión temporal; (c-f) frecuencia de inmersión cada 4, 8, 12 y 16 h, respectivamente; (g-j) volumen de medio de cultivo por explante a 100, 75, 50 y 25 mL, respectivamente y suministro de aire (k-n) cada 4, 8, 12 y 16, respectivamente. Barra = 1.



**Figura. 8.** Contenido total de clorofila durante la multiplicación *in vitro* de *A. potatorum* a los 60 días de cultivo. a) Medio semisólido y medio líquido a diferentes frecuencias de inmersión, b) volúmenes de medio de cultivo líquido por explante, c) suministros de aire. **IT**: Inmersión temporal, **SA**: Suministro de aire.

## 7. 6. Aclimatización

Al evaluar el porcentaje de supervivencia *ex vitro* durante la aclimatización, no se encontraron diferencias entre los sistemas de cultivo, frecuencias de inmersión, diferentes volúmenes de medio de cultivo por explante y suministro de aire evaluados. Esto se debe a que en todos los tratamientos el porcentaje de supervivencia en promedio estuvo entre el 97.3 y el 98.6 %. La Figura 9 muestra las plantas micropropagadas de agave obtenidas a los 30 y 90 d de cultivo en condiciones de invernadero.



**Figura 9.** Plantas micropropagadas de *Agave potatorum* obtenidas de los diferentes tratamientos a los a) 30 y b) 90 días de aclimatización bajo condiciones de invernadero.

## 8. DISCUSIÓN

### 8. 1. Evaluación de diferentes sistemas de cultivo

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el sistema de cultivo en inmersión temporal tiene un mayor desarrollo *in vitro* en *A. potatorum* en comparación con sistema de cultivo en medio semisólido. La micropropagación en medio semisólido ha sido reportado en varias

especies del género agave como *A. salmiana* (Puente-Garza *et al.*, 2017), *A. americana* (Naziri *et al.*, 2019), *A. sisalana* (Nikam *et al.*, 2019) y *A. angustifolia* albino (Sara *et al.*, 2020). La inmersión temporal tienen ventajas sobre los sistemas en medio semisólido debido a que presentan una tasa de crecimiento más rápida, mayor disponibilidad de nutrientes y reguladores del desarrollo, así como la dilución de exudados que pueden inhibir el crecimiento de las plantas *in vitro* (Mehrotra *et al.*, 2007). Sin embargo, la frecuencia de inmersión evaluada en el primer experimento (2 min de inmersión cada 8 h) presentó mayor porcentaje hiperhidricidad. De acuerdo a Bayraktar *et al.* (2020), este desorden fisiológico puede ser ocasionado por exceso de nutrientes, baja irradiancia lumínica, alta humedad relativa (HR) y alta disponibilidad de agua. En este estudio, la hiperhidricidad fue ocasionada, entre otras causas, debido a una elevada HR en el ambiente del cultivo y alta disponibilidad de agua y nutrimentos ocasionada probablemente por la alta frecuencia de inmersión evaluada.

En este estudio los resultados muestran que la IT incrementa casi cinco veces más el número de brotes por explante respecto al sistema de cultivo en medio semisólido. Esto se debe a que los sistemas de inmersión temporal han demostrado su potencial para la micropropagación a gran escala en muchas especies de plantas mejorando la disponibilidad de los componentes del medio de cultivo (Etienne y Berthouly, 2002; Paek *et al.*, 2005). En un estudio realizado por Martínez-Estrada *et al.* (2019) en anturio (*Anthurium andreanum* Lind) se obtuvo un incremento en el número de brotes por explante 7 veces mayor respecto al medio semisólido después de 45 días de cultivo. De manera similar Arano-Avalos *et al.* (2020) en malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) la producción de brotes aumentó tres veces más en IT respecto al medio semisólido. Recientemente, Leyva-Ovalle *et al.* (2020) lograron duplicar la producción de brotes de guaria morada (*Guarjanthe skinneri* Bateman Dressler et W. E.).



## **8. 2. Evaluación de diferentes frecuencias de inmersión**

La determinación de la frecuencia de inmersión es de suma importancia para el escalamiento de la micropropagación en biorreactores debido a que controla la disponibilidad de los componentes del medio de cultivo, intercambio gaseoso y humedad relativa. En *A. potatorum* la frecuencia de inmersión cada 12 h mostró tener una mayor tasa de multiplicación y longitud de brote, obteniendo además un menor porcentaje de hiperhidricidad. Al respecto Mosqueda *et al.* (2017) no encontraron diferencias significativas en la tasa de multiplicación en el cultivo de gerbera (*Gerbera jamesonii*) entre las frecuencias de inmersión de 4 min cada 6, 8 y 12 h; sin embargo, las frecuencias de 4 min cada 8 y 12 h produjeron los brotes más largos con menos síntomas de hiperhidricidad. En anturio, Martínez-Estrada *et al.* (2019) sugieren el uso de la inmersión de 2 minutos cada 12 h debido a que se requiere menos energía eléctrica por día para el funcionamiento del compresor y la válvula solenoide que conforman el SIT. Por otra parte Ramírez-Mosqueda *et al.* (2019) informaron que el tiempo de inmersión óptimo para el cultivo de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks) es de 2 min cada 4 h. Se ha reportado que los tiempos de inmersión más largos pueden reducir el intercambio de gases a la superficie celular y dificulta la formación de meristemas (Jackson, 2005).

## **8. 3. Evaluación del volumen de medio de cultivo por explante**

El volumen de medio de cultivo en IT es un factor que permite controlar aspectos fisiológicos durante el desarrollo *in vitro* de los explantes. En *A. potatorum*, el volumen de medio de cultivo no afectó el porcentaje de hiperhidricidad. Sin embargo, al no encontrar diferencia significativa para las variables número y longitud de brote entre los volúmenes 100, 75 y 50 mL, se seleccionó el volumen de 50 mL por explante con el propósito de hacer eficiente el consumo de medio de

cultivo por explante. Nuestros resultados concuerdan con Lorenzo *et al.* (1998) para el cultivo de caña (*Saccharum officinarum* cv. C-1051-73) donde el volumen 50 mL por explante aumentó la producción de brotes. En el cultivo de lima (*Citrus × latifolia* (Yu. Tanaka) Yu. Tanaka) al utilizar 40 mL por explante se aumentó el número y longitud de brotes por explante (Bulbarela-Marini *et al.*, 2019). Recientemente, San José *et al.* (2020) en el cultivo de *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn, al aumentar el volumen a 18.8 mL de medio por explante logró incrementar el número de brotes por explante.

#### **8. 4. Evaluación del suministro de aire**

En *A. potatorum* al aplicar aire adicional en el biorreactor redujo el porcentaje de hiperhidricidad en todas las frecuencias evaluadas. Nuestros resultados concuerdan con Mosqueda *et al.* (2017) en el cultivo de gerbera debido a que el porcentaje de hiperhidricidad se redujo drásticamente de 31.3 a 5.24 % y no se observaron cambios en el número y longitud de brotes. Sreedhar *et al.* (2008) en *Stevia rebaudiana* reportaron que el porcentaje de hiperhidricidad se redujo a medida que disminuyó la frecuencia de inmersión de 6 a 12 h. Yoeup y Chakrabarty (2003) en manzana (*Malus domestica*) al suministrar un segundo flujo de aire dentro del sistema de inmersión se redujo la hiperhidricidad de 17.11 % al 8.24 %. De acuerdo a Etienne y Berthouly (2002) al ajustar el tiempo y frecuencia de inmersión es posible reducir la hiperhidricidad debido a un mejor control de la humedad relativa. El intercambio de aire que ocurre durante la inmersión temporal puede estimular la funcionalidad estomática y aumento en la síntesis de clorofila, promoviendo así la actividad fotosintética. Esto se debe a que el uso aire adicional en TI permite un mayor flujo de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, lo que hace que las plantas *in vitro* mejoren su capacidad mixotrófica.

## 8. 5. Contenido de clorofila

El contenido de clorofila es importante para determinar indirectamente la tasa fotosintética de plantas bajo condiciones *in vitro*. En *A. potatorum* el cultivo en medio semisólido y las frecuencias de inmersión más distantes (12 y 16 h) mostraron un incremento significativo en el contenido de clorofilas. Huylenbroeck y Debergh (1996) mencionan que el contenido de sacarosa en el medio de cultivo podría inhibir la síntesis de clorofila, la fotosíntesis y el ciclo de Calvin. En inmersión temporal, en la frecuencia 4 y 8 h al tener un mayor contacto con el medio de cultivo los explantes mostraron menor contenido de clorofila. Esto pudo ser causa de un aumento en la concentración de sacarosa debido a que en inmersión temporal los explantes pueden asimilar los componentes del medio de cultivo tanto en la zona basal como en la parte aérea de explantes; mientras que, en medio de cultivo semisólido, la asimilación de nutrimentos y compuestos orgánicos son asimilados de la parte basal del explante, esto podría explicar también el incremento en el contenido de clorofilas en medio semisólido. Regueira *et al.* (2018) reportaron que la concentración de sacarosa, así como el tiempo de exposición de los explantes produce una disminución en las cantidades de clorofila en mimbre (*Salix viminalis*). Por otra parte Martínez-Estrada *et al.* (2019) no encontraron diferencias significativas en el contenido de clorofila entre diferentes tiempos de inmersión cada 4, 8 y 12 h para anturio. En malanga Arano-Avalos *et al.* (2020) reportaron que los brotes inmersos en frecuencias más cortas 1, 2 y 4 h mostraron mayor contenido de clorofila total.

Para volumen por explante no hubo diferencia significativa en los valores de clorofila total para los tratamientos con 100, 75 y 50 mL; sin embargo, se presentó una disminución en el contenido de clorofila para el tratamiento con 25 mL de medio de cultivo por explante. Esto debido probablemente a la baja disponibilidad de nutrientes. El contenido de clorofila también puede ser

un indicador del estatus nutricional de la planta debido a que gran parte del nitrógeno y magnesio encontrado en los tejidos es utilizado para la síntesis de clorofila (Moran *et al.*, 2000).

Las concentraciones de clorofila total para suministro de aire aumentaron cuando los periodos de ventilación fueron más cortos (4 y 8 h) y disminuyeron cuando fueron más largos (12 y 16 h). Al incrementar la ventilación en los sistemas pudo haber una distribución de aire más homogénea en los recipientes de cultivo, aumentando probablemente las cantidades de gases, promoviendo de un estado heterótrofo hacia un estado autótrofo, también llamado mixotrofismo *in vitro*. Se ha reportado que una mayor concentración de CO<sub>2</sub> dentro de los frascos de cultivo aumenta la tasa fotosintética de las plantas *in vitro* (Nguyen y Kozai, 2001; Khan *et al.*, 2003; Hoang *et al.*, 2020)

## **8. 6. Aclimatización**

La supervivencia de las plantas *in vitro* garantiza el éxito del proceso de micropropagación. En nuestro estudio, a pesar de que la mayoría de los agaves tuvieron escaso sistema radicular, los brotes mostraron altas tasas de supervivencia en todos los tratamientos evaluados (95-98 %). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Martínez-Estrada *et al.* (2019) en anturio donde obtuvieron un 90 % de plantas aclimatizadas y Arano-Avalos *et al.* (2020) en malanga con 98-100 % de plantas aclimatizadas, donde tampoco se realizó una etapa de enraizamiento. Los altos porcentajes de supervivencia en *A. potatorum* probablemente se debieron a que las especies de agave son plantas nobles con pocos requerimientos de cuidados debido a que naturalmente se adaptan a diversos ambientes y sobrevive a periodos largos de sequía por su metabolismo CAM (Langlé-Argüello *et al.*, 2019). Para la especie *A. potatorum* no se necesitó una fase de enraizamiento, a diferencia de lo reportado para *Agave tequilana* (Monja-Mio *et al.*, 2020) lo que

representa una ventaja en cuanto a reducción en costos de mano de obra, reactivos, energía y se reduce el tiempo de cultivo.

## 9. CONCLUSIONES

- La multiplicación *in vitro* de brotes de agave fue mayor en inmersión temporal en comparación con el sistema de cultivo en medio semisólido, obteniendo 4.8 veces más brotes por explante en inmersión temporal; sin embargo, la hiperhidratación fue mayor en inmersión temporal.
- Se observó que las frecuencias de inmersión cada 8 h y 12 h tuvieron el mayor número de brotes por explante; sin embargo, en el tiempo de inmersión cada 12 h se redujo el porcentaje de hiperhidricidad.
- Los tratamientos con mayor cantidad de medio de cultivo por explante (100, 75 y 50 mL) promueven la producción de brotes; mientras que, menor cantidad de medio (25 ml) lo disminuye.
- El suministro de aire en cualquiera de las frecuencias evaluadas (2min cada 4, 8, 12 y 16 h) permite reducir el porcentaje de hiperhidricidad en inmersión temporal, siendo la frecuencia cada 12 h la que permite un mayor ahorro de energía sin afectar el desarrollo *in vitro*.
- Los contenidos de clorofila obtenidos en medio de cultivo semisólido y los diferentes tratamientos de inmersión temporal en medio líquido no tuvieron efecto sobre el porcentaje de sobrevivencia.

- Los diferentes sistemas de cultivo tuvieron una influencia en el contenido de clorofila. El contenido de clorofila total disminuye al reducir el volumen de medio por explante (25 mL) y las frecuencias de suministro de aire (12 y 16 h).
- Los altos porcentajes de sobrevivencia (97-98 %) durante la aclimatización se debieron, probablemente, a que la especie *A. potatorum* cuentan con un metabolismo que las ayuda a acoplarse a ambientes de estrés sin importar el sistema de cultivo *in vitro* del cual se obtuvieron.
- La regeneración *in vitro* de *A. potatorum* utilizando la técnica de inmersión puede ser utilizada en programas de mejoramiento genético para su conservación y multiplicación *in vitro*, teniendo aplicaciones prácticas en la reforestación de poblaciones silvestres y para cultivo de plantaciones comerciales para la industria mezcatera.

## 10. REFERENCIAS

- Aguirre-Dugua, X., Eguiarte, L.E., 2013. Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *J. Arid Environ.* 90, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2012.10.018>
- Arano-Avalos, S., Gómez-Merino, F.C., Mancilla-Álvarez, E., Sánchez-Páez, R., Bello-Bello, J.J., 2020. An efficient protocol for commercial micropropagation of malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) using temporary immersion. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 261, 108998. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108998>
- Bayraktar, M., Hayta-Smedley, S., Unal, S., Varol, N., Gurel, A., 2020. Micropropagation and

- prevention of hyperhydricity in olive (*Olea europaea* L.) cultivar 'Gemlik.' South African J. Bot. 128, 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.11.022>
- Berthouly, M., Etienne, H., 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation, in: Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer-Verlag, pp. 165–195. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5\\_11](https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_11)
- Bulbarela-Marini, J.E., Gómez-Merino, F.C., Galindo-Tovar, M.E., Solano-Rodríguez, L.A., Murguía-González, J., Pastelín-Solano, M.C., Núñez-Pastrana, R., Castañeda-Castro, O., 2019. The *in vitro* propagation system of *Citrus × latifolia* (Yu. Tanaka) Yu. Tanaka (Rutaceae) affects the growth and depletion of nutriment. Vitro. Cell. Dev. Biol. - Plant 55, 290–295. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09976-4>
- Colunga-GarcíaMarín, P., Zizumbo-Villarreal, D., Martínez, J., 2007. Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural. En lo ancestral hay Futur. del tequila, mezcales y otros agaves 229–248.
- Cournac, L., Dimon, B., Carrier, P., Lohou, A., Chagvardieff, P., 1991. Growth and photosynthetic characteristics of *Solanum tuberosum* plantlets cultivated *in vitro* in different conditions of aeration, sucrose supply, and CO<sub>2</sub> enrichment. Plant Physiol. 97, 112–117. <https://doi.org/10.1104/pp.97.1.112>
- Delgado-Lemus, A., Casas, A., Téllez, O., 2014a. Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacán Valley, Mexico: Bases for sustainable use of non-timber forest products. J. Ethnobiol. Ethnomed. 10, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-63>

- Delgado-Lemus, A., Torres, I., Blancas, J., Casas, A., 2014b. Vulnerability and risk management of Agave species in the Tehuacán Valley, México. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 10, 53. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-10-53>
- Escalona, M., Lorenzo, J.C., González, B., Daquinta, M., González, J.L., Desjardins, Y., Borroto, C.G., 1999. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.* 18, 743–748. <https://doi.org/10.1007/s002990050653>
- Espinosa-Leal, C.A., Puente-Garza, C.A., García-Lara, S., 2018. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta.* <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
- Etienne, H., Berthouly, M., 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* <https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>
- Félix-Valdez, L.I., Vargas-Ponce, O., Cabrera-Toledo, D., Casas, A., Cibrian-Jaramillo, A., de la Cruz-Larios, L., 2016. Effects of traditional management for mescal production on the diversity and genetic structure of *Agave potatorum* (Asparagaceae) in central Mexico. *Genet. Resour. Crop Evol.* 63, 1255–1271. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0315-6>
- Gentry, H., 2004. *Agaves of Continental North America.*
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T., 2014. Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Eng. Life Sci.* <https://doi.org/10.1002/elsc.201300166>
- Guo, J., Jiansheng Liang, B., Jin-Gui Chen, B., 2007. Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. *Int. J. Plant Dev. Biol.* 1, 1–12.
- Gutiérrez-Hernández, G., Ortiz Hernandez, Y., Jorge Corzo-Rios, L., 2020. Composición química



- y germinación de semillas de tobalá (*Agave potatorum*). *Interciencia* 45, 223–228.
- Harborne, J.B., Harborne, J.B., 1973. Nitrogen Compounds, in: *Phytochemical Methods*. Springer Netherlands, pp. 166–211. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-5921-7\\_5](https://doi.org/10.1007/978-94-009-5921-7_5)
- Harris, R.E., Mason, E.B.B., 1983. Two machines for *in vitro* propagation of plants in liquid media. *Can. J. Plant Sci.* 63, 311–316. <https://doi.org/10.4141/cjps83-032>
- Hoang, N.N., Kitaya, Y., Shibuya, T., Endo, R., 2020. Growth and physiological characteristics of wasabi plantlets cultured by photoautotrophic micropropagation at different temperatures. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 143, 87–96. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01898-z>
- Huylenbroeck, J.M., Debergh, P.C., 1996. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiol. Plant.* 96, 298–304. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00217.x>
- Jackson, M.B., 2005. Aeration stress in plant tissue cultures, in: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer-Verlag, pp. 459–473. [https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5\\_35](https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5_35)
- Kim, E.K., Hahn, E.J., Murthy, H.N., Paek, K.Y., 2004. Enhanced shoot and bulblet proliferation of garlic (*Allium sativum* L.) in bioreactor systems. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 79, 818–822. <https://doi.org/10.1080/14620316.2004.11511848>
- Kozai, T., Iwanami, Y., 1988. Effects of CO<sub>2</sub> Enrichment and Sucrose Concentration Under High Photon Fluxes on Plantlet Growth of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in Tissue Culture During the Preparation Stage. *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* 57, 279–288. <https://doi.org/10.2503/jjshs.57.279>

- Langlé-Argüello, L.A., Martínez-Gutiérrez, G.A., Santiago-García, P.A., Escamirosa-Tinoco, C., Morales, I., Enríquez-Del-Valle, J.R., 2019. Nutrient Solutions and Drought in Plant Growth and Fructans Content of *Agave potatorum* Zucc. HortScience 54, 1581–1584. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI14129-19>
- Lecona-Guzmán, C.A., Reyes-Zambrano, S., Barredo-Pool, F.A., Abud-Archila, M., Montes-Molina, J.A., Rincón-Rosales, R., Gutierrez-Miceli, F.A., 2017. *In vitro* propagation of *Agave americana* by indirect Organogenesis. HortScience 52, 996–999. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI10498-16>
- Leyva-Ovalle, O.R., Bello-Bello, J.J., Murguía-González, J., Núñez-Pastrana, R., Ramírez-Mosqueda, M.A., 2020. Micropropagation of *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressler et W. E. Higging in Temporary Immersion Systems. 3 Biotech 10. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2010-3>
- Lorenzo, J.C., González, B.L., Escalona, M., Teisson, C., Espinosa, P., Borroto, C., 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell. Tissue Organ Cult. 54, 197–200. <https://doi.org/10.1023/A:1006168700556>
- Loyola, V.M., Ochoa, N., 2018. Culture Protocols.
- Maene, L., Debergh, P., 1985. Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting *in vivo*. Plant Cell. Tissue Organ Cult. 5, 23–33. <https://doi.org/10.1007/BF00033566>
- Martínez-Estrada, E., Islas-Luna, B., Pérez-Sato, J.A., Bello-Bello, J.J., 2019. Temporary immersion improves *in vitro* multiplication and acclimatization of *Anthurium andreanum* Lind. Sci. Hortic. (Amsterdam). 249, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.01.053>

- Martínez, S., Nuñez-Guerrero, M., Gurrola-Reyes, J.N., Rutiaga-Quiñones, O.M., Paredes-Ortíz, A., Soto, O.N., Flores-Gallegos, A.C., Rodríguez-Herrera, R., 2019. Mescal an alcoholic beverage from *Agave spp.* with great commercial potential, in: Alcoholic Beverages: Volume 7: The Science of Beverages. Elsevier, pp. 113–140. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815269-0.00004-0>
- Mehrotra, S., Goel, M.K., Kukreja, A.K., Mishra, B.N., 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. African J. Biotechnol. <https://doi.org/10.4314/ajb.v6i13.57591>
- Mitalipov, S., Wolf, D., 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 114, 185–199. [https://doi.org/10.1007/10\\_2008\\_45](https://doi.org/10.1007/10_2008_45)
- Monja-Mio, K.M., Herrera-Alamillo, M.A., Sánchez-Teyer, L.F., Robert, M.L., 2019. Breeding strategies to improve production of agave (*Agave spp.*), in: Advances in Plant Breeding Strategies: Industrial and Food Crops. Springer International Publishing, pp. 319–362. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-23265-8_10)
- Monja-Mio, K.M., Olvera-Casanova, D., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M.Á., Sánchez-Teyer, F.L., Robert, M.L., 2020. Improving of rooting and *ex vitro* acclimatization phase of *Agave tequilana* by temporary immersion system (BioMINT™). Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10109-5>
- Monja-Mio, K.M., Robert, M.L., 2013. Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer culture. Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant 49, 541–549. <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9535-7>
- Moran, J.A., Mitchell, A.K., Goodmanson, G., Stockburger, K.A., 2000. Differentiation among

- effects of nitrogen fertilization treatments on conifer seedlings by foliar reflectance: A comparison of methods. *Tree Physiol.* 20, 1113–1120.  
<https://doi.org/10.1093/treephys/20.16.1113>
- Moreno-Calles, A.I., Casas, A., 2010. Agroforestry systems: Restoration of semiarid zones in the Tehuacán Valley, central Mexico. *Ecol. Restor.* 28, 361–368.  
<https://doi.org/10.3368/er.28.3.361>
- Mosqueda Frómata, O., Escalona Morgado, M.M., Teixeira da Silva, J.A., Pina Morgado, D.T., Daquinta Gradaille, M.A., 2017. *In vitro* propagation of *Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooker f. in a temporary immersion bioreactor. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 129, 543–551.  
<https://doi.org/10.1007/s11240-017-1186-7>
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Naziri, M., Sadat, S., Howyzeh, M.S., 2019. The effect of different hormone combinations on direct and indirect somatic embryogenesis in *Agave americana*. *Iran. J. Plant Physiol.* 9, 2739–2747.
- Nikam, T.D., Bansude, G.M., Aneesh Kumar, K.C., 2003. Somatic embryogenesis in sisal (*Agave sisalana* Perr. ex. Engelm). *Plant Cell Rep.* 22, 188–194. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0675-9>
- Nikam, T.D., Mulye, K. V., Chambhare, M.R., Nikule, H.A., Ahire, M.L., 2019. Reduction in hyperhydricity and improvement in *in vitro* propagation of commercial hard fibre and medicinal glycoside yielding *Agave sisalana* Perr. ex Engelm by NaCl and polyethylene

- glycol. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 138, 67–78. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01603-9>
- Paek, K.Y., Chakrabarty, D., Hahn, E.J., 2005. Application of bioreactor systems for large scale production of horticultural and medicinal plants, in: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. pp. 95–116. <https://doi.org/10.1007/1-4020-3200-5-6>
- Molphe, E., Ramírez, R., Núñez, H., & Ochoa, N. (1999). *Introducción al cultivo de tejidos vegetales*. México: Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Phillips, G.C., Garda, M., 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>
- Puente-Garza, C.A., García-Lara, S., Gutiérrez-Urbe, J.A., 2017. Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave salmiana*. *Ind. Crops Prod.* 105, 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.014>
- Quynh Thi Nguyen, Kozai, T., 2001. Growth of *in vitro* banana (*Musa spp.*) shoots under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 37, 824–829. <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0137-4>
- Radding, C., 2012. The children of mayahuel: Agaves, human cultures, and desert landscapes in northern Mexico. *Environ. Hist. Durh. N. C.* <https://doi.org/10.1093/envhis/emr118>
- Ramírez-Mosqueda, M.A., Cruz-Cruz, C.A., Cano-Ricárdez, A., Bello-Bello, J.J., 2019. Assessment of different temporary immersion systems in the micropropagation of anthurium (*Anthurium andreanum*). *3 Biotech* 9. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1833-2>
- Ramírez-Mosqueda, M.A., Iglesias-Andreu, L.G., 2016. Evaluation of different temporary

- immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Plant* 52, 154–160. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9735-4>
- Rangel-Landa, S., Casas, A., Dávila, P., 2015. Facilitation of *Agave potatorum*: An ecological approach for assisted population recovery. *For. Ecol. Manage.* 347, 57–74. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.03.003>
- Regueira, M., Rial, E., Blanco, B., Bogo, B., Aldrey, A., Correa, B., Varas, E., Sánchez, C., Vidal, N., 2018. Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. *Trees - Struct. Funct.* 32, 61–71. <https://doi.org/10.1007/s00468-017-1611-x>
- Ríos-Ramírez, S. del C., Enríquez-del Valle, J.R., Rodríguez-Ortiz, G., Ruíz-Luna, J., Velasco-Velasco, V.A., 2018. *In vitro* formation of adventitious shoots on caulinary tissue of physiologically contrasting *Agave angustifolia* plants. *Emirates J. Food Agric.* 30, 49–56. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i1.1584>
- Robert, M.L., Herrera-Herrera, J.L., Castillo, E., Ojeda, G., Herrera-Alamillo, M.A., 2006. An efficient method for the micropropagation of *Agave* species., in: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). pp. 165–178. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:165>
- Rodríguez-Sahagún, A., Acevedo-Hernández, G., Rodríguez-Domínguez, J.M., Rodríguez-Garay, B., Cervantes-Martínez, J., Castellanos-Hernández, O.A., 2011. Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequilana* Weber var. Azul. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 104, 271–275. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9815-4>
- Ruta, C., De Mastro, G., Ancona, S., Tagarelli, A., De Cillis, F., Benelli, C., Lambardi, M., 2020. Large-scale plant production of *Lycium barbarum* L. By liquid culture in temporary immersion system and possible application to the synthesis of bioactive substance. *Plants* 9, 1–10.

<https://doi.org/10.3390/plants9070844>

San José, M.C., Blázquez, N., Cernadas, M.J., Janeiro, L. V, Cuenca, B., Sánchez, C., Vidal, N., 2020. Temporary immersion systems to improve alder micropropagation. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01937-9>

Sara, H.C., René, G.H., Rosa, U.C., Angela, K.G., Clelia, D. la P., 2020. *Agave angustifolia* albino plantlets lose stomatal physiology function by changing the development of the stomatal complex due to a molecular disruption. *Mol. Genet. Genomics* 295, 787–805. <https://doi.org/10.1007/s00438-019-01643-y>

Sebbenn, A.M., Degen, B., Azevedo, V.C.R., Silva, M.B., de Lacerda, A.E.B., Ciampi, A.Y., Kanashiro, M., Carneiro, F. da S., Thompson, I., Loveless, M.D., 2008. Modelling the long-term impacts of selective logging on genetic diversity and demographic structure of four tropical tree species in the Amazon forest. *For. Ecol. Manage.* 254, 335–349. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.08.009>

Sha Valli Khan, P.S., Kozai, T., Nguyen, Q.T., Kubota, C., Dhawan, V., 2003. Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Biol. Plant.* 46, 161–166. <https://doi.org/10.1023/A:1022844720795>

Sreedhar, R. V., Venkatachalam, L., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., Narayan, M.S., Ravishankar, G.A., 2008. Direct organogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana* and cultivation in bioreactor. *Biol. Plant.* 52, 355–360. <https://doi.org/10.1007/s10535-008-0073-9>

Teisson, C., Alvard, D., 1995. A New Concept of Plant *In vitro* Cultivation Liquid Medium: Temporary Immersion. Springer, Dordrecht, pp. 105–110. <https://doi.org/10.1007/978-94->

011-0307-7\_12

- Tisserat, B., Vandercook, C.E., 1985. Development of an automated plant culture system. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 5, 107–117. <https://doi.org/10.1007/BF00040307>
- Torres, I., Casas, A., Vega, E., Martínez-Ramos, M., Delgado-Lemus, A., 2015. Population Dynamics and Sustainable Management of Mescal Agaves in Central Mexico: *Agave potatorum* in the Tehuacán-Cuicatlán Valley. *Econ. Bot.* 69, 26–41. <https://doi.org/10.1007/s12231-014-9295-2>
- Trejo-Salazar, R.-E., Eguiarte, L.E., Suro-Piñera, D., Medellín, R.A., 2016. Save Our Bats, Save Our Tequila: Industry and Science Join Forces to Help Bats and Agaves. *Nat. Areas J.* 36, 523–530. <https://doi.org/10.3375/043.036.0417>
- Yoeup, P.K., Chakrabarty, D., 2003. Micropropagation of Woody Plants Using Bioreactor, in: Jain, S.M., Ishii, K. (Eds.), *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 735–755. [https://doi.org/10.1007/978-94-010-0125-0\\_25](https://doi.org/10.1007/978-94-010-0125-0_25)