



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, MEDIANTE ORGANOGENÉESIS Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA]

Sandra Yarensy Martínez-Martínez, Amaury Martín Arzate-Fernández*,
Carlos Alvarez-Aragón, Irene Martínez-Velasco
and Tomás H. Norman-Mondragón

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

Email: * amaury1963@yahoo.com.mx.

*Corresponding author

SUMMARY

Background. The genus *Agave* has social, cultural, environmental and economic importance in Mexico. Approximately 15 species of agave are used as raw material for the production of mezcal, among them is the *Agave marmorata* Roelz, which is considered the longest-lived agave for the preparation of this drink because its maturation period ranges from 20 to 35 years. Agave plant tissue culture is a technique that allows obtaining plants by organogenesis (O) and / or somatic embryogenesis (ES) in a short period of time. The quality and quantity of plants propagated by these methods can be favored with the use of Temporary Immersion Systems (SIT). **Objective.** Establish a protocol for the regeneration of *A. marmorata* seedlings in SIT, with the methods of direct organogenesis and indirect somatic embryogenesis. **Methodology.** Two regeneration methods, direct organogenesis and indirect somatic embryogenesis, were evaluated. For the first, the effect of the frequency and number of explants grown in SIT in the sprouting and growth stages of the explant was determined. For the second, the effect of the number of explants grown in SIT on the percentage of germination and the growth rate of somatic embryos was evaluated. **Results.** The best treatment in the sprouting stage was obtained with 80 explants grown in SIT with an immersion frequency of 8 h and an immersion time of 2 min, with 84% sprouting and 17.5 sprouts / explant of 1 cm in height. The best growth of the explants originated from direct organogenesis was obtained with 180 cultured explants per flask with an immersion frequency of 8 hours and an immersion time of 2 min. On the other hand, in the somatic embryogenesis method, the highest percentage of embryo germination (62.2%) was achieved with 80 somatic embryos cultured in SIT with an immersion frequency of 8 hours. **Implications.** The results of this research contribute to a better understanding of the regeneration process of direct organogenesis and somatic embryogenesis in temporary immersion systems. This can help to scale the system commercially and to conserve germplasm. **Conclusions.** It was possible to establish an effective protocol for the regeneration of agave seedlings. **Keywords:** mezcal; plant tissue culture; automation; mass propagation.

RESUMEN

Antecedentes. El género *Agave* tiene importancia social, cultural, ambiental y económica en México. Aproximadamente 15 especies de agave se emplean como materia prima para la elaboración de mezcal, entre ellas se encuentra el *Agave marmorata* Roelz, el cual se considera el agave más longevo para la preparación de esta bebida debido a que su periodo de maduración va de 20 a 35 años. El cultivo de tejidos vegetales de agave es una técnica que permite obtener plantas mediante organogénesis (O) y/o embriogénesis somática (ES) en un corto periodo de tiempo. La calidad y cantidad de plantas propagadas por estos métodos se pueden favorecer con el uso de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). **Objetivo.** Establecer un protocolo de regeneración de plántulas de *A. marmorata* en SIT, con los métodos de organogénesis directa y embriogénesis somática indirecta. **Metodología.** Se evaluaron dos métodos de regeneración, organogénesis directa y embriogénesis somática indirecta. Para el primero, se determinó el efecto de la frecuencia y número de explantes cultivados en SIT en las etapas de brotación y crecimiento del explante. Para el segundo, se evaluó el efecto del número de explantes cultivados en SIT sobre el porcentaje de germinación y el crecimiento de embriones somáticos. **Resultados.** El mejor tratamiento en la etapa de brotación se obtuvo con 80 explantes cultivados en SIT con una frecuencia de inmersión de 8 h y un tiempo de inmersión de 2 min, con 84% de brotación y 17.5 brotes/explante de 1 cm de altura. El mejor crecimiento de los explantes

† Submitted August 31, 2020 – Accepted April 8, 2021. This work is licensed under a CC-BY 4.0 International License.
ISSN: 1870-0462.

originados a partir de organogénesis directa, se obtuvo con 180 explantes cultivados por frasco con una frecuencia de inmersión de 8 h y un tiempo de inmersión de 2 min. Por otro lado, en el método de 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 h. **Implicaciones.** Los resultados de este estudio contribuyen a una mejor comprensión del proceso de regeneración mediante organogénesis directa y embriogénesis somática en sistemas de inmersión temporal. Esto puede ayudar al escalamiento del sistema a nivel comercial y a la conservación del germoplasma. **Conclusiones.** Se logró establecer un protocolo efectivo para la regeneración de plántulas de agave. **Palabras clave:** mezcal; cultivo de tejidos vegetales; automatización; propagación masiva.

INTRODUCCIÓN

El género *Agave* es originario del continente americano, se distribuye en Estados Unidos de América, México, América Central y del Sur. Este grupo está constituido por aproximadamente 200 especies, de las cuales México cuenta con 75% y 65% de estas especies 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 debido a que esta bebida es considerada como la bebida nacional de mayor precio en el país (CRM, 2020).

Entre las 15 especies de agave que se emplean en la producción de mezcal, se encuentra el *Agave marmorata* Roelz (CRM, 2020), su destilado es apreciado por los conocedores del mezcal por su sabor, aroma y rareza. Esta especie se distribuye en los estados de Oaxaca y Puebla, su inflorescencia es valorada por los pobladores, por su belleza y las propiedades curativas que se le atribuyen. Sin embargo, las poblaciones silvestres se encuentran amenazadas por la sobreexplotación, la destrucción de su hábitat y el aumento de la producción de mezcal, debido a que esta última actividad afecta las poblaciones al cortar el tallo floreciente y eliminar la planta en campo.

El cultivo de tejidos vegetales se propone como una alternativa que permite la conservación, la propagación masiva y el mejoramiento genético de especies vegetales. La regeneración de plántulas se puede realizar mediante organogénesis (O) y/o embriogénesis somática (ES), ambos, directa o indirectamente. Estos métodos promueven la capacidad de las células vegetales para generar órganos, tejidos u organismos completos a partir de una célula. Para lograrlo se han empleado distintos sistemas de cultivo, entre los que se encuentran: semisólido y líquido. Sin embargo, uno de los principales problemas relacionados con el uso de medios líquidos es la hiperhidricidad en los tejidos vegetales por lo que, recientemente, se han empleado los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). El uso de SIT resulta en mayores tasas de multiplicación con

menor manipulación y mano de obra y, por consecuencia, menores costos de producción (Feuser *et al.*, 2003; Steinmacher *et al.*, 2011). Escalona *et al.* (1999) desarrollaron los SIT para la micropropagación de piña y, más tarde, otros estudios informaron la eficiencia de este sistema en otras especies de plantas (Etienne y Berthouly, 2002; Niemenak *et al.*, 2008; Steinmacher *et al.*, 2011). Este sistema permite automatizar el proceso de micropropagación, controlar las condiciones físicas (luz, temperatura, intercambio gaseoso, etc.), disminuir los costos de producción y aumentar la productividad y la eficiencia de la micropropagación (Escalona *et al.*, 1999).

Cabe señalar que al utilizar los SIT existen varios parámetros de cultivo que son importantes para optimizar un protocolo de micropropagación, 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 (Gao *et al.*, 2015).

Hasta ahora, no se ha reportado el uso de SIT en la regeneración de *A. marmorata*, por lo que se plantea establecer un protocolo de regeneración de plántulas de *A. marmorata* en SIT, mediante organogénesis directa y embriogénesis somática indirecta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del material vegetal

Se utilizaron semillas maduras de *A. marmorata*, donadas por el Centro Regional Universitario Sur Oaxaca, Programa Maguey-Mezcal, de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH).

Desinfección del material vegetal

Se emplearon 560 semillas de *A. marmorata*, las cuales fueron lavadas con agua de grifo con 2 mL de detergente líquido lavatrastes de la marca KIRKLAND® y dos gotas de Tween® 20 por 15 min. Posteriormente, dentro de una campana de flujo laminar, las semillas se sumergieron en etanol al 70% durante 1 min, después en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 15 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y luego se sumergieron en 16 µL L⁻¹ de gentamicina durante 15 min. Finalmente,

las semillas tratadas fueron estratificadas en nanopartículas de plata (AgNP's) (marca Silver Plant) en una concentración de 50 mg L⁻¹ durante 24 h a 4 °C.

Métodos de regeneración

La propagación masiva de plántulas de *A. marmorata* se llevó a cabo mediante organogénesis directa y embriogénesis somática indirecta.

Organogénesis directa (OD)

La propagación mediante OD se dividió en tres etapas:

OD Etapa 1: Germinación de semilla

En 23 frascos de polipropileno se colocaron 20 semillas (en cada frasco) previamente desinfectadas. Se utilizaron frascos con capacidad de 470 mL y provistos de 80 mL de medio de cultivo con 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. El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 ± 0.1 con NaOH o HCl, y luego se esterilizó 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, en condiciones de fotoperiodo de 16 h 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 porciones de 460 plántulas provenientes de semillas germinadas *in vitro*, como explantes para la inducción de brotes. Para esto, a las plántulas con una altura aproximada de 5 cm, se les eliminaron las hojas y raíces, y la porción restante, que contenía los tejidos meristemáticos, fue cultivada en dos diferentes sistemas de cultivo: semisólido (SS) y SIT. Para comparar el efecto de 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). Para el cultivo SS se utilizaron frascos de polipropileno de 470 mL y para los SIT se utilizaron frascos de cristal de 940 mL, la dosificación del medio de cultivo fue 80 y 500 mL, respectivamente.

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

Se utilizaron tres frascos de cultivo por tratamiento para los dos sistemas (SS y SIT) y los cultivos fueron

incubados durante 60 d a una temperatura de 25 ± 2 °C, con 16 h de fotoperiodo.

OD Etapa 3: Crecimiento de brotes

Los brotes generados en el mejor tratamiento de OD Etapa 2, 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. El medio de cultivo utilizado fue compuesto por sales MS al 50%, 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.5 g L⁻¹ de carbón activado y 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 OD Etapa 2. Se utilizaron tres frascos de cultivo por tratamiento y los cultivos se mantuvieron incubados durante 30 d a una temperatura de 25 ± 2 °C en condiciones de 16 h de fotoperiodo.

Embriogénesis somática (ESI)

La propagación mediante ESI se dividió en las siguientes etapas:

ESI Etapa 1: Inducción de callo embriogénico

Se colocaron 10 semillas de *A. marmorata* por caja, 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), compuesto por sales 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 y 8 g L⁻¹ de agar. Los cultivos se incubaron durante 60 d a una temperatura de 25 ± 2 °C en condiciones de completa oscuridad.

Posteriormente, para inducir callo embriogénico, los callos con un peso aproximado de 0.20 g fueron transferidos a frascos de vidrio de 125 mL provistos de 35 mL de medio de cultivo. El medio de cultivo estuvo compuesto por 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 con fotoperiodo de 16 h.

ESI Etapa 2: Maduración de embriones somáticos

Los callos embriogénicos con un peso aproximado de 0.5 g se transfirieron a frascos de vidrio provistos de

35 mL de medio. Se empleó el medio de cultivo propuesto por Alvarez-Aragón *et al.* (2020) compuesto por sales MS al 50%, 0.1 mg L⁻¹ de 2,4-D, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 8 g L⁻¹ de agar. Los cultivos se mantuvieron incubados durante 30 d a una temperatura de 25 ± 2 °C con fotoperiodo de 16 h.

ESI Etapa 3: Germinación y crecimiento de embriones somáticos

Como explantes se emplearon embriones somáticos en fase escutelar generados en la ESI Etapa 2 y fueron transferidos a un medio de cultivo compuesto por sales MS al 50%, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 0.5 g L⁻¹ de carbón activado, libre de RCV.

Se evaluó el efecto de la cantidad de explantes cultivados, de esta manera, se ensayaron tres tratamientos: 20, 40 y 80 explantes cultivados en SIT de 940 mL provistos de 500 mL de medio de cultivo. Para lo cual, se utilizó la frecuencia y tiempo de inmersión que resultó el mejor tratamiento en la OD Etapa 2. Los cultivos se mantuvieron incubados durante 30 d a una temperatura de 25 ± 2 °C con fotoperiodo de 16 h.

Aclimatación de plántulas

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

Después de la etapa de aclimatación, se comparó el crecimiento de las plántulas en dos sistemas: en sustrato y semi-hidropónico, a los 60 d. Para el sistema en sustrato, las plántulas fueron transferidas a bolsas negras de polietileno de 10 x 15 cm con sustrato compuesto de tierra y agrolita (1:1). Para el sistema semi-hidropónico, las plántulas se colocaron en vasos de plástico blanco 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 y viernes; y 3 min en la tarde los martes, jueves y sábados.

Variables evaluadas

Se calculó el promedio de las siguientes variables:

OD Etapa 2: porcentaje de brotación [(número de explantes con brotes) *100/número de explantes cultivados], número de brotes por explante y longitud de los brotes.

OD Etapa 3: longitud de plántula y raíz, diámetro basal, número de hojas y raíces.

ESI Etapa 3: longitud de plántula, diámetro basal y número de hojas, porcentaje de germinación de embriones e hiperhidricidad.

Porcentaje de plántulas aclimatadas: (número de plántulas supervivientes*100) /número de plántulas aclimatadas a condiciones *ex vitro*.

Crecimiento de plántulas: longitud de plántula y raíz, diámetro basal y número de hojas y raíces.

Las variables de longitud y diámetro se midieron con un vernier digital marca Steren®.

Análisis estadístico

En el presente trabajo, el diseño experimental fue completamente al azar y los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza con el 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)

OD Etapa 2: Inducción de brotación

Se obtuvo 84% de brotación de tejido vegetal de *A. marmorata* en SIT, con 17.5 brotes/explante, lo cual fue significativamente superior a lo obtenido en SS (Tabla 1). Este resultado concuerda con lo reportado por Ross y Castillo (2010) quienes, al utilizar SIT, lograron incrementar la multiplicación de *Achyrocline flaccida* de 4 a 11 brotes/explante al cambiar de un sistema semisólido a SIT. Por otra parte, Castro y González (2002) lograron una tasa de multiplicación de 11.5 brotes por explante en *Eucalyptus grandis*, mientras que, Alvarenga y Salazar (2015) obtuvieron hasta 13 brotes por explante en *Stevia rebaudiana*. Los resultados sugieren que hay mayor eficiencia en la producción de brotes en SIT, debido a 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 [semisólido (SS) y Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)] en la inducción de brotes de *A. marmorata* obtenidos por organogénesis directa, a los 60 d en medio de inducción con diferentes frecuencias de inmersión y número de explantes cultivados.

Sistema de cultivo	Frecuencia de inmersión (h)	Explantes cultivados/SIT (No.)	Volumen de medio de cultivo/explante (mL)	Brotación (%)	Brotes/explante (No.)	Longitud de brote/explante (cm)
SS	na	10	8.00	20	2.5±0.24 ^e	1.1±0.08 ^a
SIT	4	20	25.00	60	3.3±0.28 ^{de}	0.6±0.04 ^c
		40	12.50	55	4.5±0.38 ^d	0.6±0.05 ^c
		80	6.25	89	4.4±0.33 ^d	0.8±0.07 ^b
		20	25.00	75	7.1±0.49 ^c	1.0±0.07 ^{ab}
	8	40	12.50	83	10.3±0.59 ^{cb}	0.9±0.05 ^{ab}
		80	6.25	84	17.5±0.80 ^a	1.0±0.05 ^{ab}

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

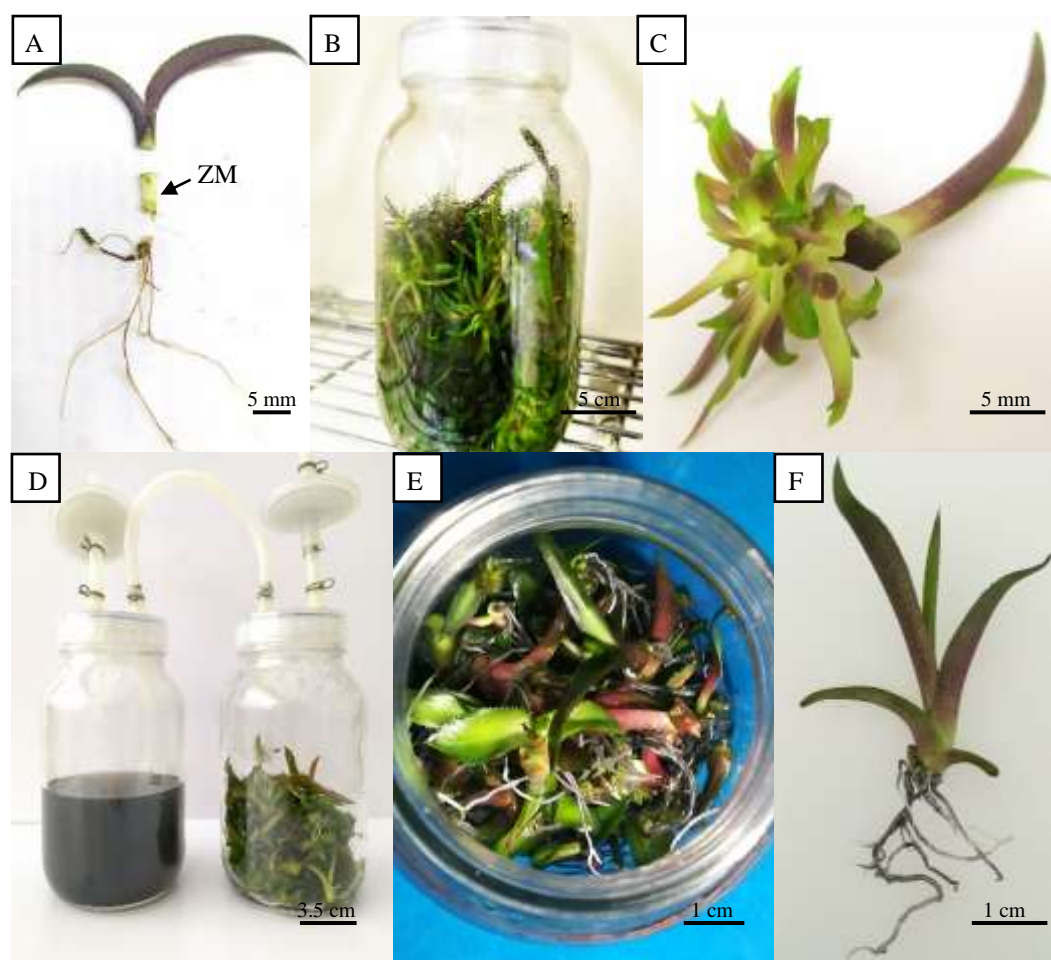


Figura 1. Regeneración de plántulas de *A. marmorata* en SIT mediante organogénesis directa. A) Explante seleccionado (la flecha indica la zona meristemática: ZM) para la etapa de inducción de brotación B) SIT en el tratamiento con 80 explantes en etapa de brotación. C) Explante con brotes, originado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

La aparición de los primeros brotes en la zona meristemática del tallo (Figura 1.A) comenzó 15 d después de que los explantes fueron cultivados en el medio de brotación. El número de brotes por explante fue afectado por la frecuencia de inmersión, donde el mayor número de brotes (7.1, 10.3 y 17.5) se presentó en la frecuencia de 8 h, independientemente al número de explantes por contenedor. Esto concuerda con lo obtenido por Steward *et al.* (1952) quienes, al cultivar *Daucus carota*, atribuyeron una mejor respuesta, respecto al número de brotes, 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 el efecto positivo en los explantes debido a la ventilación forzada con aire, que contiene concentraciones de gas, y a la alta humedad relativa dentro del frasco.

Se logró el mayor porcentaje de brotación 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). Asimismo, con este volumen de medio de cultivo, se obtuvo mayor número de brotes/explante (Tabla 1). Lorenzo *et al.* (1998) demostraron que el medio óptimo para la proliferación de brotes de caña de azúcar fue de 50 mL/explante. En el presente trabajo, con volúmenes menores, se observó un aumento en el porcentaje de brotación, una posible explicación radica en la secreción 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 los SIT. Williams (1995) menciona que los tejidos vegetales pueden contribuir a cambios en el medio de cultivo, ya sea por la absorción de sustancias del medio o por la secreción de estas al medio. Adicional a la secreción de compuestos fenólicos u otras toxinas, los cationes y aniones exudados, o ácidos orgánicos, pueden alterar el pH del medio y con ello favorece la brotación. Por su parte, Escalona *et al.* (1999) sugieren que el cambio en el pH del medio utilizado para el cultivo de *Ananas comosus* en SIT, puede atribuirse a la captación o secreción diferencial de iones NO_3^- y NH_4^+ y / o acumulación de ácido carbónico, como consecuencia del metabolismo ácido de las crasuláceas.

OD Etapa 3: Crecimiento de brotes

La longitud de plántula y de raíz de *A. marmorata* fueron estadísticamente significativas entre el número de explantes cultivados (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 la

reportado en otras especies como en *Psidium guajava* (Feria-Silva *et al.*, 2003) donde con menor número de explantes cultivados en SIT se logró 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, probablemente relacionado con la concentración de reguladores de crecimiento endógenos de la especie. Por otra parte, las variables número de hojas, número de raíces y diámetro basal no presentaron diferencia significativa.

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

Con los resultados obtenidos en la etapa de crecimiento de brotes, se puede permitir el cultivo de mayor cantidad de explantes por contenedor, conservar y/o aumentar el vigor de las plántulas y, esto se podría traducir en una disminución de los costos de producción a nivel comercial. De acuerdo con Etienne y Berthouly (2002) uno de los parámetros clave para disminuir los costos de producción es la reducción en el número de contenedores y en el manejo de materiales, por lo tanto, al cultivar los recipientes con 180 explantes se disminuye 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 (vitricación), es decir, la malformación morfogénica (Ziv, 2005). En el presente estudio, en ninguna de las etapas del proceso de propagación mediante 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), quienes no informaron de ningún síntoma de hiperhidricidad en la micropropagación de brotes de banana cultivados en SIT, mientras que, los tallos sumergidos en un medio líquido con aireación continua de burbujas revelaron hiperhidricidad en las vainas externas de las hojas.

Tabla 2. Efecto del número de explantes cultivados, en Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), en el crecimiento de plántulas de *A. marmorata* obtenidas mediante organogénesis directa a los 30 d.

N° de explantes cultivados	Longitud de plántula (cm)	Longitud de raíz/brote (cm)	N° de hojas/brote	N° de raíces/brote	Diámetro basal/brote (mm)
80	2.8±0.27 ^b	0.9±0.08 ^b	3.4±0.31 ^a	1.6±0.15 ^a	5.3±0.50 ^a
120	4.0±0.35 ^a	1.2±0.10 ^b	2.7±0.24 ^a	0.9±0.08 ^a	6.0±0.52 ^a
180	4.5±0.37 ^a	3.3±0.28 ^a	2.9±0.25 ^a	1.6±0.14 ^a	6.6±0.57 ^a

Letras iguales a nivel de columna indican que no hay diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Embriogénesis somática indirecta (ESI)

ESI Etapa 1: Inducción de callo embriogénico

La desdiferenciación de los ejes embrionarios cigóticos maduros de *A. marmorata* se observó a los 5 ddic, comenzó con la formación de callo en forma de bellota en la zona meristemática apical, debajo de la cobertura cónica que rodea al ápice (cofia), y presentó coloración beige y blanco, respectivamente (Figura 2.A). Esta coloración está relacionada con 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 100% de formación de callo en los explantes y un peso de 0.5 g por explante a los 60 ddic. La inducción de callo embriogénico (Figura 2.B) se logró a los 90 ddic en 70% de los explantes, se obtuvieron callos friables de coloración verde a amarillo traslúcido. La coloración verde se debe principalmente a altas concentraciones de citocininas (BA) las cuales, incrementan el contenido de clorofila a través de la diferenciación del cloroplasto y, por consiguiente, la capacidad fotosintética (Portillo *et al.*, 2007).



Figura 2. Regeneración de plántulas de *A. marmorata* en SIT, mediante embriogénesis somática. A) Desdiferenciación celular del embrión cigótico a los 5 ddic. B) Callo embriogénico a los 90 ddic. C) Embriones somáticos en estado escutelar (es). D) Embrión germinado. E) Plántulas regeneradas a partir de embriogénesis somática a los 150 ddic. cp=cofia; c=callo.

ESI Etapa 2: Maduración de embriones somáticos

Los embriones somáticos en fase escutelar (Figura 2.C) a los 120 ddic 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), al utilizar la misma concentración de BA (10 mg L⁻¹) y sugieren que los resultados se pueden deber a que las citocininas incrementan la sensibilidad del tejido al estímulo de las auxinas y este incremento en la sensibilidad, a su vez favorece la diferenciación celular. Cabe señalar que ambos reguladores participan en la dinámica del ciclo celular, importante en el proceso de diferenciación y posterior germinación de embriones somáticos (Monsalve-Gonzales *et al.*, 2005).

ESI Etapa 3: Germinación y crecimiento de embriones somáticos

La germinación de los embriones somáticos de *A. marmorata* se llevó a cabo en SIT y se encontró 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 con el ajuste de 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 dependieron de la especie, pues en el caso de *C. canéfora*, cuando se emplearon cuatro inmersiones al día de 15 min cada una, las cuales se aplicaron con éxito a *C. 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 de *A. marmorata*, cultivados en SIT, en la germinación de embriones somáticos.

N° 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 *A. marmorata* 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 mayor longitud de plántula (2.97 cm), longitud de raíz (7.27 cm) y diámetro basal (3.85 mm). Se observó 100% de

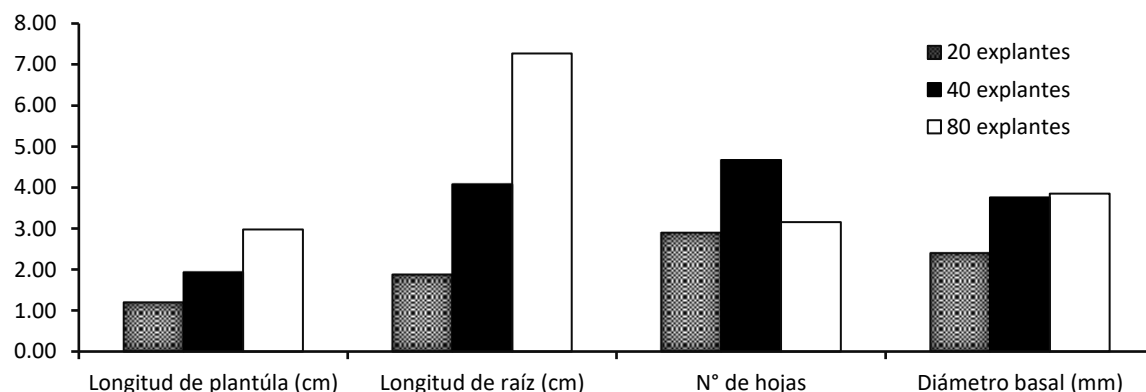


Figura 3. Efecto del número de embriones somáticos de *A. marmorata* cultivados en SIT en la etapa de crecimiento.

enraizamiento en las plántulas regeneradas *in vitro* a partir de ES (Figura 2.E). Lo anterior, concuerda con lo reportado con Etienne *et al.* (1999) quienes en *C. arabica* encontraron efecto altamente significativo en el número de explantes cultivados, con respecto a la longitud de los ejes embrionarios, peso fresco y longitud de la planta.

Propagación mediante OD y ESI

El cultivo de tejidos vegetales ha sido utilizado con diversos fines en diferentes especies del género *Agave* desde hace varios 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 (Domínguez *et al.*, 2008). En la presente investigación, para la regeneración de plántulas de *A. marmorata* vía OD, se requirió de un mayor número de explantes iniciales (450); sin embargo, la regeneración de plántulas a través de este método es amplia en el cultivo de tejidos vegetales (Pérez-Molphe, 1999). En contraste con lo anterior, la ESI tiene varias ventajas sobre la organogénesis, entre ellas que requiere un menor número de explantes iniciales (100 semillas), aunque no es 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 paso a la automatización del proceso empleando SIT. Además, la organogénesis es el proceso en el cual las células y los tejidos tienen 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 con raíz y brote (Thorpe, 1993). De esta forma, la organogénesis requiere de una etapa de enraizamiento, mientras que, en ESI esta etapa es eliminada.

Por otro lado, las plántulas regeneradas mediante OD no mostraron signos de hiperhidricidad en comparación con las obtenidas mediante ESI. 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* respecto al número de explantes cultivados en SIT con ambas técnicas de regeneración (OD y ESI). En OD se registró un incremento en el porcentaje de brotación y número de brotes/explante y en ESI se observó un incremento en el porcentaje de germinación de embriones somáticos, longitud de la planta y raíz, número de hojas y diámetro basal, cuando se cultivaron mayor número de explantes y, por ende, menor volumen de medio de cultivo/explante. Esto probablemente se deba a que *A. marmorata* es una planta suculenta con metabolismo ácido crasuláceo y la anatomía de estas plantas les permite almacenar agua en sus células, tejidos y órganos, y aumentar la eficiencia en el uso del agua respecto a las plantas con metabolismo C3 y C4 (Nobel, 2011).

Independientemente de la diferencia en la vía de regeneración (OD vs ESI), ambos tipos de sistemas de micropropagación, establecidos en el presente estudio para *A. marmorata*, podrían usarse como un método de regeneración *in vitro* para otros cultivares. Sin embargo, es necesario estudiar las variaciones genéticas del material regenerado por ambos métodos, ya que se ha comprobado que diversos 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, con el uso de SIT 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.

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

TIPO DE SISTEMA	cp (cm)	cr (cm)	ch	cnr	cdb (mm)
Sustrato	0.2±0.09 ^b	0.7±0.08 ^b	1.1±0.17 ^b	2.2±0.56 ^b	2.8±0.40 ^b
Semi-hidropónico	6.3±0.37 ^a	5.6±0.37 ^a	2.5±0.29 ^a	8.8±0.60 ^a	11.±0.54 ^a

cp=crecimiento de longitud plántula, cr=crecimiento de longitud radicular, ch=crecimiento de número de hojas, cnr= crecimiento de número de raíces, cdb= crecimiento de diámetro basal. Letras iguales significa que no hay diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$).



Figura 4. Aclimatación y crecimiento de plántulas regeneradas de *A. marmorata* en condiciones *ex vitro*. A) Plántulas 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.

Aclimatación de plántulas

Después de 2 semanas en aclimatación surgieron nuevas hojas y raíces, y a las 3 semanas se logró el 100% de plantas de *A. marmorata* aclimatadas. 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 efecto significativo en el crecimiento de las plántulas en comparación con las establecidas en sustrato (Tabla 4), donde se incrementó 6.3 cm la longitud de plántula, 5.6 cm la longitud de raíz, 11 mm el

diámetro basal y el número de hojas y raíces aumentó 2.5 y 8.8 cm, respectivamente (Figura 4.C), valores superiores a los alcanzados en las plántulas cultivadas en sustrato. En la Figura 4.B y 4.D se observa la diferencia de crecimiento vegetativo de las plantas regeneradas, con un mayor número de hojas y una mayor longitud de plántula. En las Figuras 4.C y 4.E se aprecia el sistema radicular generado en las plántulas, después de 90 d en la etapa de crecimiento *ex vitro*, nótese mayor número de raíces y longitud de estas, en el sistema de cultivo semi-hidropónico.

Los menores valores en el crecimiento de plántula (0.2 cm), crecimiento radicular (0.7 cm), número de hojas (1.1 hojas), número de raíces (2.2 raíces) y diámetro basal (2.8 mm), obtenidos en las plántulas en sustrato, comparadas con los de las plántulas en sistema semi-hidropónico (6.3 cm, 5.6 cm, 2.5 hojas, 8.8 raíces y 11 mm, respectivamente), podrían relacionarse con una limitación en la humedad del suelo. El abastecimiento de nutrientes al sistema radical en sustrato también es un factor que está ligado estrechamente a la absorción de agua, debido a que los nutrientes 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 nutrientes en el sustrato podría ser menor comparado con el sistema semi-hidropónico.

Por otra parte, hay otros factores que afectan la disponibilidad de nutrientes 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 nutrientes se encuentran en forma iónica en la solución y su acceso a las raíces es inmediato, contrario al sustrato, donde existen diversas fuerzas fisicoquímicas que podrían limitar su disponibilidad.

CONCLUSIONES

Se presenta el primer reporte que sugiere la posibilidad de producción de brotes y embriones somáticos de *A. marmorata* a gran escala a través de sistemas SIT.

El mayor número de plántulas regeneradas por explante se alcanzó utilizando la vía de regeneración de ESI, y la frecuencia de inmersión de 2 min cada 8 h resultó la más eficiente en ambos sistemas de micropropagación (OD y ESI).

Todas las plántulas regeneradas se adaptaron a condiciones *ex vitro*, y se logró un mayor desarrollo y crecimiento en 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. Asimismo, 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.

REFERENCIAS

- Abdelnour A., Aguilar, M.A. y Valverde, L. 2011. Micropropagación de pílón (*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* Roezl, 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. 15:693-698.
- Arzate-Fernández, A. M. y Mejía-Franco, R. 2011. Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. Revista de Fitotecnia Mexicana. 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. y Etienne, H. 2005. Sistema de inmersión temporal: un nuevo concepto de uso de medio líquido en la propagación masiva. En: Hvorslef-Eide AK, Preil W. (eds) Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation. Springer, Dordrecht. DOI: 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.
- Dominguez, M., González, M., Rosales, C., Quiñonez, C., Delgadillo, S., Mireles, S. y Pérez, E. 2008. El cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. Investigación y ciencia. 16(41):53-62.
- 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 Reports. 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-Yoeup, P. 2005. Multiplication of *Chrysanthemum* shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. En: A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds.), Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation. Pp. 143-153.
- 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. Biotecnología 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. DOI: 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. Theoretical and Applied Genetics. 60:197-214. DOI: 10.1007/BF02342540
- 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. Respuestas. 1:21-28. DOI: 10.22463/01228
- 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, D. y 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. En: A.K. Hvoslef-Eide y W. Preil (eds.), Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation. 95-116.
- 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 Science. 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. 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 Cellular Developmental Biology—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. In: Hvoslef-Eide A.K., Preil W. (eds) *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Springer, Dordrecht. PP. 1-18 DOI: 10.1007/1-4020-3200-5_1
- 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. DOI: <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. DOI: <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. En: M. Terzi *et al.* (eds.) *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. 105-110.
- Thorpe, T. E. 1993. *In vitro* organogenesis and somatic embryogenesis: physiological and biochemical aspects. En: K. A. Roubelakis-Angelakis *et al.* (eds.), *Morphogenesis in Plants*. 19-38.
- 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. En: Aitken-Christie, T. Kozai y M. Lila Smith (eds.), *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture*. 405-439.
- Ziv, M. 2005. Simple bioreactors for mass propagation of plants. En: A.K. Hvoslef-Eide y W. Preil (eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. 21-40.