



Informe técnico de Residencia Profesional

Licenciatura en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

Fermín Jonapá Hernández

“Propagación de *Agave americana* L. utilizando sistemas
De Inmersión temporal RITA®”

Asesor Interno: Dr. Federico A. Gutiérrez Miceli

Asesor Externo: Dr. Carlos Alberto Lecona Guzmán

Periodo:

Agosto-Diciembre 2017

JUSTIFICACIÓN

El *Agave americana* L. es una planta originaria de Centro América, en el Estado de Chiapas, se encuentra principalmente en el municipio de Comitán, esta especie de Agave se ha utilizado como recurso natural para la producción de una bebida alcohólica; conocida como Comiteco. Dentro del cultivo de esta planta existen problemas que aquejan a los productores, uno de ellos es la disminución en el rendimiento de cultivos de dicha planta, ocasionada por la enfermedad de marchitez por el hongo *Fusarium oxysporum*, afectando importantemente la calidad de cosecha. Cabe mencionar que en el estado actualmente más de 300 productores se dedican a esta actividad, los cuales ubican sus zonas de producción en diferentes regiones del estado. San Fernando, Suchiapa, Chiapa de Corzo, Soyaló, Villaflores, así como Acala y Comitán ⁽¹⁾. Actualmente se están implementando protocolos de micropropagación para desarrollar líneas de plantas resistentes al hongo *Fusarium oxysporum*. Dentro de los protocolos de micropropagación los objetivos principales son obtener un gran número de ejemplares viables para poder ser aclimatadas, sin embargo este proceso representa costos elevados en la producción. Los altos costos de producción generalmente limitan el uso comercial de la micropropagación a productos con un valor unitario muy alto, como plantas ornamentales, plantas de follaje y cultivos frutales seleccionados⁽²⁾, para ello en el actual proyecto se implementó sistemas de inmersión temporal RITA ⁽³⁾, tecnología que nos permite optimizar diversos factores como el tiempo en el que el sustrato se encuentra en contacto con el tejido vegetal y maximizar el área de contacto entre el material vegetal y sustrato, disminuyendo así el tiempo de respuesta produciendo mayor cantidad de biomasa de manera más eficiente.

INTRODUCCIÓN

Si bien la micropropagación ofrece varias ventajas sobre las técnicas de propagación convencionales para la clonación de materiales de siembra seleccionados, la micropropagación puede ser una tecnología de producción impredecible y costosa. Las técnicas actuales requieren un gran número de pequeños recipientes, medios semisólidos y una división aséptica de los tejidos vegetales a mano. La micropropagación de plantas involucra transferencias periódicas de material de plantación de medios vivos, de 4 a 6 semanas, debido al agotamiento de los nutrientes en el medio y también debido al continuo crecimiento y proliferación del tejido, que se ve rápidamente limitado por el tamaño del contenedor de cultivo ⁽²⁸⁾. Los productos Agar no son inertes y complican la automatización. La embriogénesis somática en comparación con la organogénesis es el protocolo del biorreactor de menor intensidad de trabajo ⁽²⁹⁾. Según Aitken-Christie y Jones (1987), un requisito previo para automatizar la organogénesis es un sistema de cultivo en el que los brotes o embriones somáticos se pueden producir en el mismo recipiente durante un largo período sin transferencia, permitiendo la recolección regular o completa de brotes o embriones somáticos para aclimatación y conversión de plantas, respectivamente. Por ello la importancia de desarrollar un protocolo en el cual se determine la concentración de Picloram o 2,4-D en la cual el material vegetal (*A. americana*) obtenga mayor respuesta, poniendo a inducir diferentes secciones del meristemo dividido en basal, media y apical, y a partir de ello los callos obtenidos se incorporaron a los reactores para obtener embriones viables los cuales posteriormente se deberían de complementar su desarrollo en plántulas hasta una etapa de aclimatación.

MARCO TEÓRICO

Agave americana L.

Todas las especies de la familia Agavaceae son nativas de América y se clasifican en ocho géneros. Se supone que el 75% de todas las especies pertenecientes a la familia Agavaceae se encuentran en México con 55% siendo endémico. El género *Agave*, perteneciente a la familia Agavaceae, surgió hace aproximadamente 15 millones de años ⁽⁴⁾. Aunque *Agave americana* L. aún no es una especie amenazada en México, su distribución se ha reducido ya que su hábitat natural está disminuyendo como resultado de la explotación, especialmente en el sur de México. *A. americana* se utiliza para la producción de fibras textiles ⁽⁵⁾ y se ha utilizado en medicina tradicional como agente natural de extinción en animales ya que las hojas contienen altas concentraciones de saponinas ^(6y7). Se informó el aislamiento de un nuevo homoisoflavonoide de hojas de *A. americana*. Ocho compuestos esteroideos, incluidos tres nuevos glucósidos de hecogenina, se aislaron a partir de hojas fermentadas de *A. americana* ⁽⁸⁾. En Chiapas (México), *A. americana* se ha cultivado para la producción de "comiteco", una bebida alcohólica local. La multiplicación de *A. americana* ocurre a través de los tallos y la germinación de la semilla, pero su tasa de propagación es baja en su entorno natural ⁽⁹⁾. Como se observa en la imagen 1. El *A. americana* es una planta perenne acaule resistente a terrenos áridos cuya hoja suculentas son grandes (1-2 m por 15-25 cm), lanceoladas, de color blanco-azulado, blanco-grisáceo, verde o variegadas. Se disponen en espiral alrededor del centro donde permanecen enrolladas a un corto tallo central ⁽¹⁰⁾. Poseen espinas a lo largo de los bordes, que pueden ser ondulados o dentados, de casi 2 cm. Una espina apical de unos 5 cm de longitud y de hasta 1 cm de ancho en la base.



Figura 1. *A. americana*

Micropropagación

La micropropagación vegetal emplea técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales aprovechando la totipotencialidad de las células vegetales, característica que permite regenerar y multiplicar tejidos y células vegetales partiendo de un fragmento hasta formar una planta completamente nueva, ⁽¹¹⁾ permitiendo así la proliferación e inducción de un grupo de células, luego se expresan como yemas axilares o apicales y/o como raíz, en condiciones asépticas. Así se puede obtener cientos y hasta miles de plántulas genéticamente idénticos en un periodo relativamente corto y en espacios pequeños. Alternando la proporción de hormonas se puede inducir a las plántulas a que desarrollen raíces sin que proliferen y se multipliquen en nuevas plantas completas. Las plantas producidas por micropropagación no solo tienen la ventaja de ser genéticamente idéntica sino que también carecen de infecciones bacterianas o fúngicas ya que se parte de una mínima masa de tejido y se trabaja en condiciones asépticas durante todo el proceso de clonación. Una vez finalizado el proceso de clonación obtenida la cantidad deseada de plántulas se procede a la rusticación, que consiste en la aclimatación de las plántulas, a las condiciones naturales del medio ambiente. Esta aclimatación debe ser gradual y debe tener en cuenta las condiciones de humedad y luz. ⁽¹²⁾

Reguladores de crecimiento vegetal Los reguladores de crecimiento vegetal o fitohormonas son sustancias extraídas de los tejidos vegetales y sustancias sintéticas, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de alguna manera cualquier proceso fisiológico en plantas ⁽³²⁾. El crecimiento en las plantas es un proceso dinámico, complejo y rigurosamente controlado. Los reguladores del crecimiento vegetal juegan un papel principal en el control del crecimiento, no únicamente dentro de la planta como universo, sino también a nivel de órgano, tejido y célula ⁽³³⁾. Son cinco tipos básicos de sistemas químicos de reguladores de crecimiento vegetal, divididos en tres grupos principales; promotores de crecimiento: Auxinas, Citocininas, Giberelinas, Etileno y Acido abscisico

Auxinas.

Las auxinas son hormonas vegetales, fitohormonas, indispensables para la regulación del crecimiento y el tropismo de los órganos vegetales. Junto con las citoquininas (lee más de ellas aquí) y las giberelinas regulan la mayoría de los procesos fisiológicos en vegetales. Las auxinas se han descrito en todo el mundo vegetal, desde algas y bacterias hasta plantas superiores y hongos. El ácido Indolacético (IAA) es la auxina más común en las plantas y se forma a partir del L-triptófano. Los estudios llevados a cabo con el IAA y otros compuestos sintéticos que actúan como él es que el anillo indólico es esencial para su funcionamiento. Éste resulta ser una estructura bicíclica formada por un anillo de 5 carbonos (un pirrol) y un benceno de 6 carbonos. El indol es una molécula aromática y por tanto volátil, lo que hace que las auxinas tengan diferente capacidad para permanecer

en la planta dependiendo de los residuos que se unan al doble anillo. Por ejemplo, el NAA es más volátil que el IAA. ⁽³¹⁾

Función y método de acción: Las auxinas estimulan el crecimiento, la división o la elongación, de las células. La elongación de las células viene dada por el aumento de su volumen interno. Al llegar a la célula la auxina causa dos reacciones. La primera más rápida estimula el movimiento de las vesículas de la célula, así como la síntesis de ATPasas y enzimas que degradarán la pared celular, para dar sitio al crecimiento celular. La respuesta lenta estimula la transcripción de genes implicados en la síntesis de una nueva pared celular.

2,4-D y Picloram

En los herbicidas del tipo 2,4-D y Picloram, que son hormonas sintéticas de crecimiento, su acción principal se basa en la imitación de sustancias químicas, que puede sustituir al ácido indolacético (hormona vegetal) influyendo en la expansión de las paredes celulares. Como se observa en la figura 2 el 2,4-D y Picloram son compuestos cíclicos aromáticos, con diferencia de que el Picloram contiene en su composición un cloro más respecto al 2,4-D y en su estructura contiene un grupo amino haciéndolo más susceptible a rupturas heterolíticas.

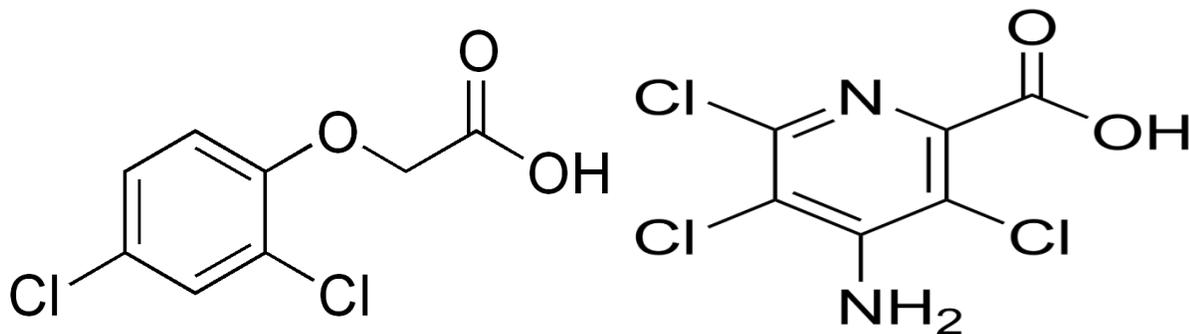


Figura 2. Estructuras químicas del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y Picloram.

El efecto de los ácidos cloroalifáticos, bloqueadores de los ácidos pirúvicos y acéticos se hacen visibles sobre las plantas, en forma de una coloración verde pálida, debido a la falta de capas cerosas en las hojas jóvenes debido a la falta de lubricación a medida de su desarrollo. ⁽³⁴⁾

Embriogénesis

La embriogénesis somática es un importante experimento diseñado por F. C. Steward de la universidad de Cornell. Se utilizó el cultivo para producir embriones de zanahoria a partir de células individuales de la raíz. El método es denominado embriogénesis somática porque los embriones surgen de células vegetativas (somáticas), es un extraordinario ejemplo de la totipotencialidad de las células vegetales. La embriogénesis somática también es una herramienta versátil para la propagación clonal ya que se ha utilizado con éxito con una gran variedad de plantas como por ejemplo el maíz, el trigo y el sorgo. ⁽¹³⁾

Sistemas de inmersión temporal RITA.

El cultivo a gran escala de cultivos diferenciados (embriones, brotes, plántulas, raíces adventicias o transformadas) y cultivos de plantas indiferenciadas (células suspendidas) podría realizarse cultivándolos in vitro en medios líquidos, bajo condiciones ambientales controladas en sistemas de biorreactores. El concepto central de ese enfoque es lograr la producción económicamente factible de cantidades máximas de biomasa vegetal, aplicaciones listas para usar o aislamientos subsecuentes de productos valiosos. El biorreactor es una tecnología especializada equipo, diseñado para cultivo intensivo mediante la regulación de diversos factores nutricionales y/o físicos ⁽¹⁴⁾. Los sistemas de biorreactor usualmente consisten en un recipiente de cultivo y un bloque de control automatizado. El recipiente de cultivo está diseñado para acomodar las células cultivadas en medio ambiente y para asegurar su crecimiento máximo, brindando oportunidades para mantener condiciones microambientales, nutrientes y transferencias de masa gaseosa óptimas. El bloque de control automatizado es un sistema computarizado, completamente automatizado o semiautomatizado, diseñado para monitorear y controlar las condiciones de cultivo en el recipiente de cultivo, tales como la velocidad de agitación, temperatura, concentración de disoluciones de oxígeno y carbono (CO₂), régimen de iluminación, pH, composición del medio húmedo superpuesto y el nivel del medio líquido. De acuerdo con la naturaleza del entorno que rodea las células cultivadas, los biorreactores existentes podrían clasificarse en cuatro clases principales: biorreactores en fase líquida, biorreactores en fase gaseosa, sistemas de inmersión temporal (TIS) y biorreactores híbridos. En biorreactores de fase líquida, los cultivos cultivados están completamente sumergidos en un medio nutriente líquido. Los biorreactores de fase líquida (incluidos los biorreactores mecánicamente agitados, agitados neumáticamente, accionados hidráulicamente y de membrana) son actualmente los sistemas mejor estudiados, lo que revela un potencial casi ilimitado de aplicaciones para la aplicación de plantas diferenciadas.⁽¹⁵⁾ Sin embargo, en la mayoría de los casos, los sistemas de biorreactores de fase líquida no aseguran un crecimiento satisfactorio de los

sistemas de plantas in vitro diferenciadas. La inmersión completa de tejidos de plantas o cultivos de órganos en el medio líquido puede causar malformaciones y pérdida de material debido a la asfixia y la hiperhidricidad ⁽¹⁶⁾. La asfixia y la hiperhidricidad son condiciones fisiológicas indeseables, causadas exclusivamente por el contenido de oxígeno y el potencial de agua de los medios de cultivo ^(16y17). La compleja morfología de tejidos y órganos vegetales diferenciados requiere el desarrollo de biorreactores con un diseño sofisticado, capaz de proporcionar un microambiente específico para asegurar el crecimiento y la integridad fisiológica de las culturas ⁽¹⁸⁾. Para superar las dificultades existentes, se han desarrollado biorreactores en fase gaseosa ^(19y20), TIS y biorreactores híbridos ^(21y22). TIS son sistemas automatizados simples, diseñados para proporcionar un entorno óptimo, mejores nutrientes y transferencias de gases, y menor estrés mecánico con el fin de reducir los trastornos fisiológicos y preservar la integridad morfológica de las culturas in vitro de plantas de crecimiento rápido diferenciadas. Los TIS proporcionan el ambiente más natural para cultivos in vitro de tejidos y órganos de plantas, donde los propágulos cultivados se sumergen periódicamente en medio líquido y luego se exponen a un ambiente gaseoso ⁽¹⁸⁾. Se han desarrollado diferentes variaciones de TIS y se aplican ampliamente en la micropropagación comercial de especies de plantas económicamente importantes ^(14,23y24). Además, debido a su diseño simple y operación flexible, los TIS se han adaptado en la investigación de la producción secundaria de metabolitos, cultivo molecular e incluso en la fitorremediación de compuestos tóxicos ⁽¹⁸⁾. La realización técnica y la operación principal de los TIS más populares, incluidos algunos diseños recientemente desarrollados, se discuten en esta revisión. También se señalan algunos ejemplos recientes de la aplicación de TIS en la producción de metabolitos secundarios derivados de plantas, expresión de proteínas extrañas, fitorremediación, micropropagación y selección clonal. Como se observa en la figura 3. El equipo de inmersión temporal consiste principalmente por una bomba compresora, una serie de filtros para aire, el cerebro en el cual se encuentran los programas encargados de suministrar aire a diferentes tiempos y en diferentes cantidades, y por último los contenedores o reactores en los que son depositados el material vegetal y una serie de microfiltros conectados en las entrada y salida de aire.

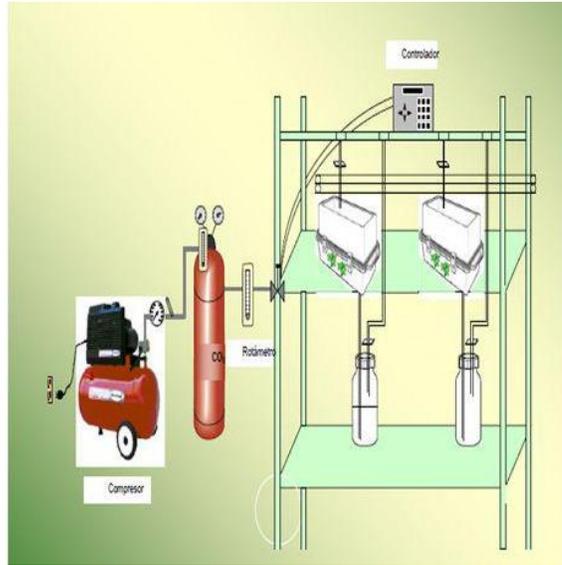


Figura 3. Esquema general de los equipos que componen los sistemas de inmersión temporal.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un protocolo de micropropagación de *Agave americana* L. mediante el sistema de inmersión temporal RITA.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Evaluar diferentes concentraciones de Picloram y 2,4-D en diferentes zona meristemática para la formación de callos.
- Determinar la mejor concentración de hormonas (picloram y 2,4-d) y zona meristemática para la formación de callos.
- Implementar ensayos en los sistemas de inmersión temporal RITA para la obtención de embriones

PROBLEMAS A RESOLVER

Dentro de los problemas a resolver es el reto que implica la implantación de los sistemas de inmersión temporal para poder obtener embriones y posteriormente plántulas viables para una aclimatación exitosa, produciendo líneas genéticamente estables y saludables con el fin de atender la demanda del sector público y privado los cuales requieren plantas resistentes a patógenos causantes de pérdidas económicas.

PROCEDIMIENTO Y DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.

El material vegetal fue obtenido de una línea de *Agave americana* L. *in vitro* del laboratorio de tejido vegetal del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez Chiapas, Carretera Panamericana Km. 1080, C.P. 29050, Apartado Postal: 599. Se emplearon 18 plántulas de 12 meses de germinación de entre 5-7cm de altura, las cuales se encontraban en medio semisólido Murashige y Skoog ⁽²⁵⁾ (MS) con 1mg/L de AIB. Las hojas exteriores y raíces se eliminaron de los tallos dejando lo más expuesto posible el meristemo de la plántulas, posterior se realizaron cortes de 0.2-0.4 cm en tres diferentes partes del meristemo (basal, media y apical). Se realizó ensayos con diferentes dos auxinas (picloram y 2,4-d) utilizando concentraciones de 0.25, 0.5 y 0.75 mg/l. cada concentración fue realizada por triplicado. Los explantes se cultivaron en medio de inducción que consistía en sales de MS con su respectiva concentración de auxina. Todos los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.7 ± 1 con una solución 0,1 N de HCl o KOH y se esterilizaron a 121 ° C durante 15 minutos. Para determinar si la composición del medio tenía algún efecto sobre la respuesta de inducción y si había una diferencia en la capacidad embriogénica de las diferentes regiones (apical, media o basal) se realizó un análisis de varianza estadístico en Statgraphics, ANOVA multifactorial.

Posterior a los dos meses de inducción el tratamiento con mayor respuesta embriogénica se utilizó en los ensayos con rectores de inmersión temporal RITA. Se emplearon tres reactores, los cuales fueron divididos en un control con 150ml de medio MS líquido con 9mg/l de BA y 0.25 mg/l de 2,4-d, dos tratamientos con 150ml de medio MS y 0.5mg/l de 2,4-d, después de ajustar a un pH de 5.7 ± 1 se esterilizaron a 121 ° C durante 15 minutos ⁽²⁶⁾.

El ensamblaje de las partes que conforman el reactor de inmersión temporal y siembra de los callos obtenidos posteriormente se serializó de manera aséptica en una campana de flujo laminar. Por último fueron conectados al sistema de inmersión temporal seleccionando un tiempo de inmersión y una frecuencia de 2min y 2horas correspondientemente.

RESULTADOS Y DISCUSIONES.

La embriogénesis somática directa se indujo a partir de segmentos de meristemos cultivados en medios semisólidos de MS suplementados con 0.25, 0.5 y 0.75µl de 2-4D y Picloram, observándose durante un periodo de 30 días que existiendo una mínima diferencia significativa (tabla1) entre las concentraciones de las auxinas usadas para el desarrollo de callos embriogénicos, a diferencia de lo obtenido por Reyes y colaboradores (2016) que lograron obtener resultados favorables con 2,4-D en combinación con BA. Aunque cabe mencionar que en nuestro trabajo se implementaron concentraciones mayores, factor que pudo intervenir en la obtención de callos, recordando así que estas auxinas principalmente sin usadas como herbicidas a altas concentraciones.

Tabla 1. Comparación estadística de las dos auxinas usadas (2,4-D y Picloram) en diferentes concentraciones.

Tratamiento mg/l	% Callo
2,4-D	
0.0	ND
0.25	18.75 ± 6.78 a ^b
0.5	20.0 ± 6.78 a
0.75	20.0 ± 6.78 a
PICLORAM	
0.0	ND
0.25	18.75 ± 6.78 a
0.5	25.0 ± 6.78 a
0.75	25.0 ± 6.78 a
^a DMS (0.05)	28.19

^a DMS: Diferencia mínima significativa (P<0.05).

^b Valores con la misma letra no muestran diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

ND: no detectado

El porcentaje callos obtenidos en los cortes de meristemo como se muestra en la tabla 1, Respecto al área de masa observada fue bajo, los callos tenían apariencia y consistencia suave y fácil para desagregar, con una coloración verde claro esto posiblemente atribuido a la presencia de las hormonas agregadas, que como se mencionó en anteriormente en el marco teórico es común observar estas características en presencia de auxinas.⁽³⁴⁾

Sin embargo entre las zonas del meristemo se observó que la zona basal desarrollo una mayor cantidad de callos con respecto a la parte media y apical, destacándose con un 53% de callos en todos los ensayos realizados.

Tabla 2. Porcentajes de callos obtenidos a partir de diferentes áreas del meristemo.

ZONA	% CALLOS
Apical	12 ± 5.53 b
Base	53 ± 5.53 a
media	20 ± 5.53 b
DMS	20.66

^a DMS: Diferencia minima significativa (P<0.05).

^b Valores con la misma letra no muestran diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

ND: no detectado

Con los callos obtenidos se realizaron los experimentos en los reactores de inmersión temporal RITA, en el cual se determinó usar un tiempo de inmersión de 2 minutos con una frecuencia de dos horas con el afán de disminuir daño hídrico (27). Se usaron los callos provenientes de la zona basal en tres reactores, como se observa en la figura 5, Los callos después de 14 días presentaron una producción de embriones, los callos presentaron segregación y en algunas partes del cuerpo que componían los callos presentaban necrosis atribuido a la agitación por el aire inyectado y el daño hídrico. Los embriones obtenidos presentaban características similares a las observadas por Lecona y colaboradores (2012) que presentaron embriones globulares, de coloración amarilla y aspecto cristalino.

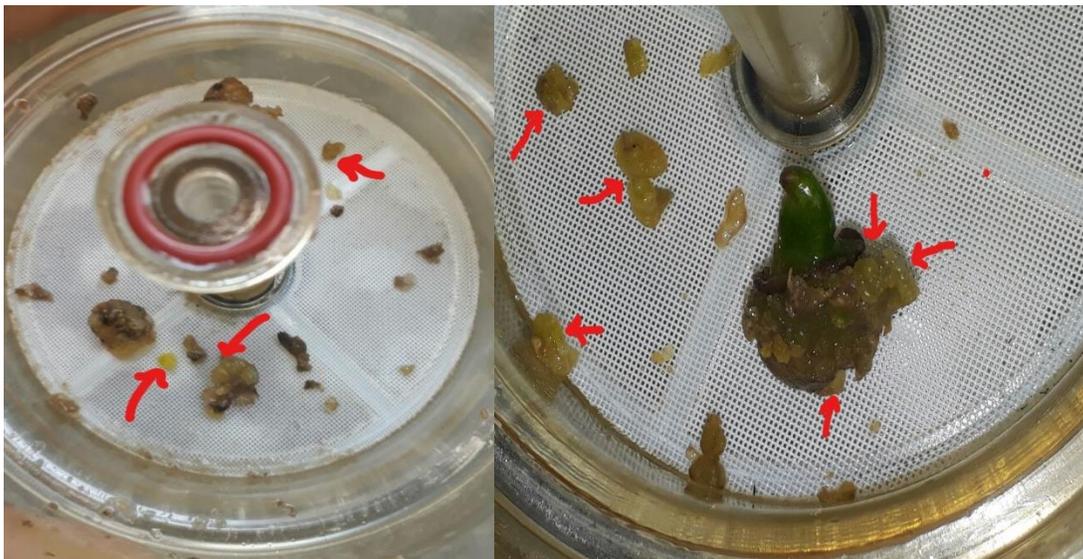


Figura 4. Obtención de embriones en reactores RITA.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Con los resultados obtenidos en la etapa de obtención de callos se llegó a la conclusión de que para la especie *Agave americana* L. no existe una diferencia en usar las auxinas Picloram y 2,4-D a diversas concentraciones. Sin embargo al usar diversas partes del meristemo se determinó que si es una variable a tomar en consideración, en este caso se obtuvo mayor producción de callos en la parte basal, posiblemente debido a la edad de las plantas usadas y la longitud de los cortes realizados, en la etapa de implementación de reactores se lograron obtener a las dos semanas de inducción los primeros embriones comprobando así la eficacia de los sistemas de inmersión temporal en cuestión al tiempo de reacción de los explantes debido a que estos tienen una mayor área de contacto con el medio. Como recomendación se puede destacar el hecho de hacer más experimentos con diferentes tiempos de inmersión y frecuencias para poder establecer un protocolo y tener un amplio espectro sobre la eficiencia de este, además de implementarlo por periodo más largo.

Competencias desarrolladas y/o aplicadas.

Dentro de las competencias que más se desarrollaron fue la implementación y correcto uso de instrumentos y equipos de laboratorio, la búsqueda y comprensión de información, uso de herramientas y análisis de datos estadísticos, la cooperación y trabajo en equipo, trabajo de campo así como manipulación de muestras recolectadas, control de agentes patógenos y aplicación de protocolos de desinfección.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1.-Redacción Aquinoticias. (2015). Gobierno de Chiapas impulsa producción de agave en el estado. 14/12/2017, de Aquinoticias Sitio web: <http://aquinoticias.mx/gobierno-de-chiapas-impulsa-produccion-de-agave-en-el-estado/>
- 2.-ROCHA, M., A. VALERA & L.E. EGUIARTE. (2005). Reproductive ecology of five sympatric *Agave littaea* (Agavaceae) species in central Mexico. *American Journal of Botany* 92(8): 1330
- 3.-Teisson C, Alvard D (1995) A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: temporary immersion. In: Terzi M, Cella R, Falavigna A (eds) *Current issues in plant molecular and cellular biology*. Kluwer Academic Publ, Dordrecht, pp 105–109.
- 4.-ROCHA, M., A. VALERA & L.E. EGUIARTE. 2005. Reproductive ecology of five sympatric *Agave littaea* (Agavaceae) species in central Mexico. *American Journal of Botany* 92(8): 1330-1341.
- 5.-HAMISSA, A.M.B., F. BROUERS, B. MAHJOUR & M. SEFFEN. 2007 Adsorption of textile dyes using *Agave americana* (L.) fibres: Equilibrium and kinetics modelling. *Adsorption and Science Technology* 25(5): 311-325.
- 6.-NASRI, S. & H. BEN SALEM. 2012. Effect of oral administration of *Agave americana* or *Quillaja saponaria* extracts on digestion and growth of Barbarine female lamb. *Livestock Science* 147(1): 59-65.
- 7.-TINTO, W.F., J.L. SIMMONS BOYCE, S. MCLEAN & W.F. REYNOLDS. 2005. Constituents of *Agave americana* and *Agave barbadensis*. *Fitoterapia* 76(6): 594-597.
- 8.-JIAN MING, J., L. XI KUI & Y. CHONG REN. 2003. Three new hecogenin glycosides from fermented leaves of *Agave americana*. *Journal of Asian Natural Products Research* 5(2): 95-103.
- 9.-ILLSLEY, C., A. TLACOTEMPA, G. RIVERA, P. MORALES, J. GARCÍA & T. GÓMEZ. 2004. Manejo campesino de magueyes mezcaleros silvestres. México. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO) 1 (1), pp. 34-45.
- 10.- Sluis CJ & Walker KA (1985) Commercialization of plant tissue culture propagation. *Intl. Assoc. Plant Tiss. Cult. Newsl.* 47: 2– 12.
- 11.-White, P. R.(1931) Plant tissue cultures. The history and present status of the problem. *Arch. exp. Zellf.* 10: 501-518.

- 12.-Helena Curtis, Adriana Schnek. (2006). Invitación a la biología. España: editorial medica panamericana. pag.61-64.
- 13.-Peter H. Raven, Ray F. Evert, Susan E. . (1992). Biología de las plantas, Volume 2. Barcelona España: Editorial Reverte. Pag: 482.
- 14.-Afreem, F.,(2006). Temporary immersion bioreactor, in: Gupta, S. D., Ibaraki, Y. (Eds.), Plan Tissue Culture Engineering, Springer, The Netherlands. pp. 187–201.
- 15.-Georgiev, M., Weber, J.,(2014) Bioreactors for plant cells: Hardware configuration and internal environment optimization as tools for wider commercialization. *Biotechnol. Lett.* 36, 1359– 1367.
- 16.-Debnath, S.,(2011) Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation—a review. *Can. J. Plant Sci.* 91, 147– 157.
- 17.-Yaseen,M.,Ahmad,T.,Sablok,G.,Standardi,A.etal.(2013),Review: Role of carbon sources for in vitro plant growth and development. *Mol. Biol. Rep.* 40, 2837–2849.
- 18.-Steingroewer,J.,Bley,T.,Georgiev,V.,Ivanov,I.etal.(2013),Bioprocessing of differentiated plant in vitro systems. *Eng. Life Sci.*, 13, 26–38.
- 19.-Weathers, P., Liu, C., Towler, M., Wyslouzil, B. (2008), Mist reactors: Principles, comparison of various systems, and case studies. *Electron. J. Integr. Biosci.*, 3, 29–37
- 20.-Weathers, P., Towler, M., Xu, J. (2010), Bench to batch: Advances in plant cell culture for producing useful products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, 1339–1351.
- 21.-Georgiev, V., Bley, T. (2012), Pavlov, A., Bioreactors for the cultivation of red beet hairy roots, in: Neelwarne, B. (Ed.), *Red Beet Biotechnology*, Springer, New York, pp. 251–281.
- 22.-Cuello, J. L., Yue, L. C. (2008), Ebb-and-Flow bioreactor regime and electrical elicitation: Eovel strategies for hairy root biochemical production. *Electron. J. Integr. Biosci.*, 3, 45–56.
- 23.-Ducos, J.-P., Terrier, B., Courtois, D. (2010), Disposable bioreactors for plant micropropagation and mass plant cell culture, in: Eibl,R.,Eibl,D.(Eds.),*Disposable Bioreactors*, Springer, Berlin Heidelberg, Germany, pp. 89–115.
- 24.-Watt, M. P. (2012), The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *Afr. J. Biotechnol.*, 11, 14025–14035.
- 25.-Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.

- 26.-Kelly M. Monja-Mio & Manuel L. Robert. (2013). Direct somatic embryogenesis of *Agave fourcroydes* Lem. through thin cell layer cult. Springer, 1, 2 de 9.
- 27.-Debnath, S.(2011), Bioreactors and molecular analysis in berry crop micropropagation—a review. *Can. J. Plant Sci.* 91, 147– 15.
- 28.-Maene L & Debergh P (1985) Liquid medium additions to established tissue cultures to improve elongation and rooting in vivo. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 5: 23–33.
- 29.-Ziv M (1995) The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Hortic.* 393: 25–3.
- 30.-Aitken–Christie J & Jones C (1987) Towards automation: radiata pine shoot hedges in vitro. *Plant Cell Tiss.Org. Cult.* 8: 185–196.
- 31.-<https://biologia.laguia2000.com/fisiologia-vegetal/hormonas-vegetales-auxinas>.
- 32.-Bidwell, R.S. (1979). *Fisología vegetal*. AGT Editor. México. D.F. 409-438.
- 33.-Wareing, R.F. & I.D. Phillips. (1973). *The control of growth and differentiation in plants*. Pergamon press. UK
- 34.-Miguel Holle, Alfredo Montes. (1985). *Manual enseñanza práctica de producción de hortalizas*. San José Costa Rica : IICA. Pag: 176.
- 35.-Carlos A. Lecona-Guzmán, Daniela Solís-Marroquín, Susana Aviles-Viñas, César De los Santos-Briones and Nancy Santana-Buzzy* . (2012). Changes in the protein profile of Habanero pepper (*Capsicum chinense* J.) somatic embryos during development . *African Journal of Biotechnology*, Vol. 11(47), pp. 10761-10768.
- 36.-Sheila Jazmín Reyes-Zambrano, Carlos Alberto Lecona-Guzmán¹, Felipe Alonso Barredo-Pool, José Dolores Ambrosio Calderón, Miguel Abud-Archila, Reiner rincón-rosales, Víctor Manuel Ruiz-Valdiviezo¹ & Federico Antonio Gutiérrez-Miceli. (2016). Plant growth regulators optimization for maximize shoots number in *Agave americana* L. by indirect organogenesis. *Gayana Bot*, 73(1), pag: 124-131.