

Micropropagación de *Agave marmorata* utilizando un Nuevo Sistema de Inmersión Temporal

Dr. Carlos Rolando Mendoza Morales¹, Dr. Ramon Dolcet-Sanjuan², Mayra Lizeth Orellana Caballero³, Mtro. Isidro López Sánchez⁴, Margarita Belen Vargas Angel⁵, David Isaac Rivera Antonio⁶

Resumen: En este trabajo se desarrolla un método de micropropagación eficiente para la producción masiva de plantas clonales libres de enfermedades. Tradicionalmente, la micropropagación en medios semisólidos es limitada en producción, debido al alto costo de mano de obra y equipamiento. Un nuevo biorreactor de bajo costo (GreenTray®), basado en el principio del sistema de inmersión temporal (TIS), se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo in Vitro de Plantas del IRTA, en el Fruitcentre, Lleida, España, y fue patentado por IRTA (Dolcet-Sanjuan and Mendoza, 2018; Patent ES2763637B1) y con protección internacional a través de PCT (WO2020109637A1). La simplicidad estructural, la facilidad de introducir y sacar el material vegetal en el biorreactor y la naturaleza modular e independiente simplifican su operación. El objetivo de este estudio fue evaluar este biorreactor en comparación con la micropropagación en medio semisólido, utilizando explantes de *Agave marmorata* donados. Se midieron los pesos frescos, la tasa de multiplicación y la longitud de las plántulas producidas. GreenTray® es adecuado para la producción en masa de agaves, con una tasa de supervivencia y calidad de la planta similares a las del medio semisólido. La tasa de multiplicación fue superior en un 30 % a la del medio semisólido. Se obtuvieron entre 300 y 500 plántulas por biorreactor, mientras que en un medio que contiene agar, se obtuvieron aproximadamente 100 brotes por frasco. Además, la longitud promedio de las plántulas fue un 28 % mayor en el GreenTray® que en el medio semisólido. El tiempo necesario para producir plantas fue de 7 semanas.

Palabras clave: Agave, marmorata, biorreactor, medio líquido micropropagación de plantas, inmersión temporal

Introducción

Aunque Puebla es un estado bioverso, se pueden ver claramente dos facetas contradictorias: por una parte, la de un estado moderno y desarrollado, pero también la de una entidad pobre y marginal, con bajos índices de desarrollo social. De la misma manera que en materia ambiental a nivel nacional, Puebla es una entidad rica en biodiversidad, pero de las primeras también en su destrucción, deterioro y contaminación, con un campo en crisis y con población rural sumida en la pobreza. Puebla es paradigma de la riqueza concentrada y pobreza generalizada. Por estos contrastes, está obligada a repensar su forma de vida y a modificar su modelo de desarrollo: así lo requiere la conservación de la riqueza de sus ecosistemas y el bienestar de sus habitantes (Estudio de Estado, Conabio, 2011).

El cultivo de agaves se presenta como una opción a considerarse para reforestar sitios degradados y para desarrollar una industria que gire en torno a los productos derivados del agave como pueden ser las bebidas alcohólicas, jarabes, mieles e inulina, entre otros.

En Puebla existe un potencial enorme para el aprovechamiento de los cultivos del agave a gran escala ya que según datos de SAGARPA (2017), todavía hay 542,779 Has. con potencial para cultivar agaves. El mezcal, bebida alcohólica elaborada a partir de diversos tipos de agave, entre ellos el agave marmorata, cuenta con la denominación de origen en 117 municipios del estado de Puebla. Lamentablemente, uno de los problemas principales para detonar esta industria es la adquisición de plantas en la cantidad requeridas y con calidad fitosanitaria.

La micropropagación es una técnica aplicada para la multiplicación rápida de plantas. Esta técnica tiene un gran impacto comercial y potencial gracias a la velocidad de propagación, la alta calidad de las plantas que se obtienen y la posibilidad de producir plantas libres de patógenos (Steward et al., 1970; Ammirato, 1985).

A diferencia de la micropropagación tradicional, los biorreactores usan medios líquidos basados en los principios de inmersión temporal (TIS). El principio de la tecnología TIS es simplemente sumergir el material vegetal en medios

¹ Carlos-Rolando Mendoza-Morales es Supervisor de la Secretaría de Educación del Estado de Puebla e investigador independiente colaborador de Madre Tierra Puebla S de RL de CV y del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA- España), croandom1@hotmail.com (autor correspondiente)

² Ramon Dolcet-Sanjuan es director del Laboratorio de Cultivo in Vitro de Plantas del IRTA en Fruitcentre, España.

³ Mayra-Lizeth Orellana –Caballero es jefa del laboratorio de cultivo de Tejidos de Madre Tierra S de RL de CV.

⁴ Isidro López-Sánchez es maestro investigador de la Universidad Tecnológica de Tehuacán (UTT).

⁵ Margarita-Belen Vargas-Angel es alumna de la UTT y becaria de Madre Tierra S de RL de CV.

⁶ David-Isaac Rivera-Antonio es alumno de la UTT y becaria de Madre Tierra S de RL de CV.

de crecimiento líquidos durante cortos períodos de tiempo. Estas inmersiones son suficientes para que la planta absorba nutrientes.

Los biorreactores se han considerado como una alternativa prometedora a la del sistema de cultivo semisólido. Sin embargo, no hay biorreactores rentables disponibles para la producción comercial de agaves. La tecnología TIS se beneficia de las ventajas de los cultivos en medio líquido, al tiempo que cultiva las plantas en entornos de alto intercambio de gases. Existen varios bioreactores comerciales que utilizan la tecnología TIS los cuales son descritos por Georgiev & Schumann (2014). Los más usados a nivel comercial y mundial son Rita® y Setis®.

El objetivo de este estudio es evaluar este biorreactor en comparación con la micropropagación en medio semisólido, utilizando explantes de *Agave marmorata* donados y poder utilizar esta metodología para su escalamiento comercial y su reproducción masiva, con la finalidad de abastecer a la industria mezcalera y productos derivados de esta planta como son la producción de mieles e inulina.

Metodología

Construcción del Bioreactor

El nuevo biorreactor GreenTray® consta de dos frascos comerciales adaptados para ser utilizados como biorreactores. En una primera instancia se utiliza uno para contener el medio en forma líquida y el otro frasco contiene a los explantes de la siguiente manera (Figura 1). El medio líquido pasa del primer matraz al segundo matraz utilizando aire a presión. El aire entrante es suministrado por una línea de 4 bar y pasa a través de un Sistema de filtración y por un Filtro 0.2 µm PTFE Midisart® 2000, para evitar cualquier contaminación. Los explantes son colocados en la charola, la cual es colocada dentro del frasco horizontal. La frecuencia de inmersión es controlada por un PLC que permite que las plantas entren en contacto con el medio por un espacio determinado de tiempo.

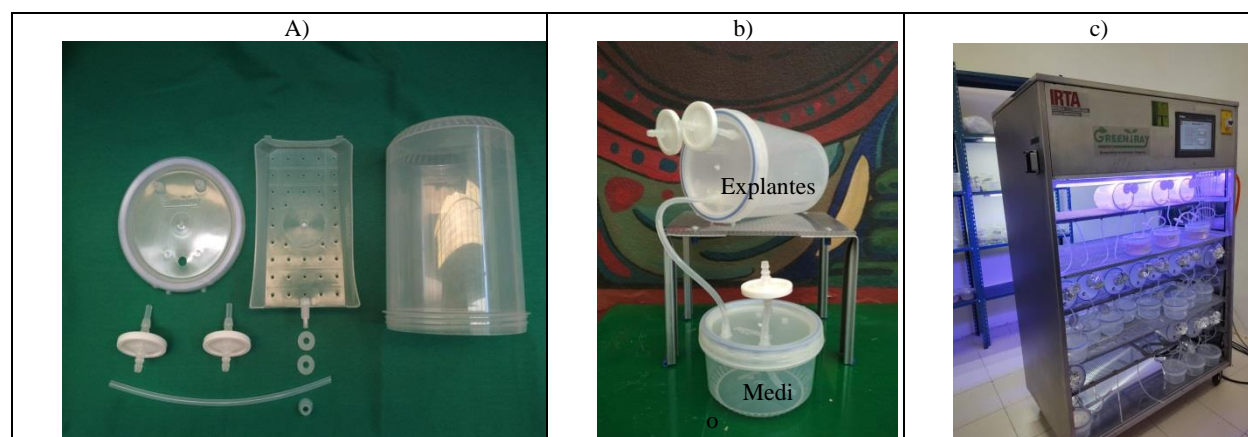


Figura 1. A) partes del GreenTray® low cost, b) GreenTray® low cost ensamblado, c) sistema automatizado para control de Biorreactores GreenTray®

Los frascos que fueron usados como medio de control fueron cultivados en medio semisólido en frascos de vidrio, como se muestra en la figura 2.

Material vegetal y medio de cultivo

Se trabajó con un agave de interés comercial: marmorata. Las plantas fueron suministradas por la empresa Madre Tierra Puebla y son parte del banco de germoplasma disponible en el laboratorio de cultivo in vitro.

Medios de cultivo

Para la fase en medio de multiplicación se utilizó MS (Murashige and Skoog, 1962) complementado con vitaminas de la marca Duchefa, usando como fuente de carbono sacarosa al 3%, 27 µM BAP (6-N benzil amino purina) y 2 µM IAA (ácido indolacético). Se fue ajustando el pH a 5.7 antes de añadir 7 g/L de agar, y en el caso de medios semisólidos, autoclavándose a 121°C por 20 minutos.

Para la fase de enraizamiento los explantes fueron cultivados en medio con 10 µM IBA (ácido Indol 3 butírico) durante 10 días, en oscuridad, y luego se transfirieron a un frasco con vermiculita en medio MS suplementado con vitaminas durante cuatro semanas más.

Para la fase de aclimatización las plántulas fueron removidas de los frascos y limpiadas con agua del grifo para quitar los residuos de agar y transferidos a un invernadero en una charola de 50 cavidades y controlando las condiciones: a una humedad relativa del 90% y a una temperatura de 26°C.

Con el fin de ajustar la concentración de sales minerales y los reguladores de crecimiento a usarse en los medios líquidos, para el GreenTray® se tomaron como base las mismas proporciones utilizadas en el medio semisólido que fueron usados para propagar pero sin agar (MS+ 27 uM BAP+2 uM IAA) durante 3 semanas. Después de este periodo se cambió el medio por uno que no contenía fitohormonas (BAP e IAA) con el fin de incrementar el tamaño de los explantes formados, dejándolos por 4 semanas más.

Los bioreactores se mantuvieron en un cuarto en un anaquel con fotoperiodo de 16 horas de luz (60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad, a temperatura de 26 ± 3 °C. La iluminación fue obtenida por una lámpara blanca LED.

Comparación del GreenTray® vs. medio semisólido en la fase de multiplicación

Explantos (plántulas de 1 cm de longitud) fueron cultivados en el frasco de control y en el GreenTray®. El mismo medio, descrito antes, fue usado para ambos sistemas. La frecuencia de inmersión en el TIS fue de 1 min cada 6 h. Setenta explantes fueron introducidos en el GreenTray®, y 15 explantes en cada frasco con medio semisólido. Se hicieron tres repeticiones. Después de tres semanas de cultivo, el medio fue cambiado a medio MS con vitaminas, sin hormonas, y 30 g L-1 de sacarosa. El número de plántulas obtenido y la longitud de las mismas fue determinado. El peso fresco y la tasa de multiplicación fue medido para cada sistema de micropropagación.

Evaluación del GreenTray® en la fase de aclimatización

Noventa plántulas de 4 a 10 cm de longitud fueron plantadas con una mezcla de peat moss + perlita (10%) Pro Mix en charolas de 50 cavidades (5X5X6.5 cm cada cavidad). Las plántulas fueron conservadas en un invernadero en condiciones (90-95 % humedad relativa y 26-30 °C).El porcentaje de sobrevivencia fue determinado tras 100 días en estas condiciones. Para esta fase no fue necesario el tratamiento con auxinas ya que por sus características este tipo de agaves suele enraizar sin necesidad de tratamientos con auxinas.

Tipo de Análisis Estadístico

Se usó un diseño experimental aleatorio en todos los experimentos. Cada experimento se llevó a cabo dos veces. Los datos se procesaron estadísticamente con el software JMP Statistics (versión 14). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) para la separación de medias.

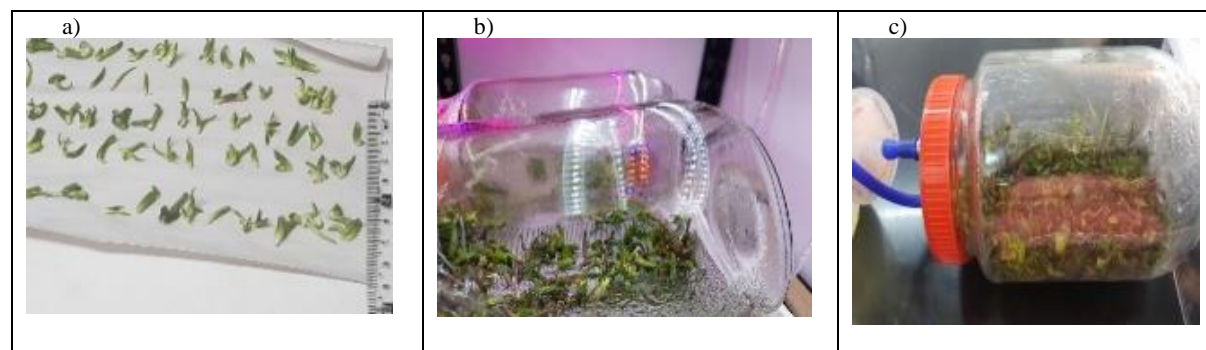


Figura 2. Evolución en el GreenTray® de Agave marmorata en los días a) inicio día 0, b)7 días fase de multiplicación, c)21 días, cambio de medio a elongación y maduración

Resultados y Análisis

Evaluación del GreenTray® en la fase de multiplicación

Se introdujeron al bioreactor explantes de 1 a 2 cm, como se observa en la figura 2a. A los 7 días ya se podía apreciar el crecimiento significativo de los explantes y comenzaron a multiplicarse (figura 2b). Para los 21 días, la multiplicación fue ya considerable, logrando llenar por completo la charola. En este punto se realizó el cambio de medio sin fitohormonas, buscando la elongación de los explantes, (figura 2c). Para el día 49, los explantes ya habían llenado por completo la charola del bioreactor, alcanzando un tamaño considerable, como se puede apreciar en las figuras 3d, e y f. Aquí se procedió a retirar los explantes del bioreactor para su posterior aclimatización. En el día 70, sin la necesidad de auxinas, se logró enraizar en un invernadero en condiciones controladas de temperatura y humedad relativa como se muestra en la figura 4g. Para el día 100, las plantas presentaban hojas lignificadas, alcanzando un tamaño de aproximadamente 10 cm (figura 4h).



Figura 3. Evolución en el GreenTray® de *Agave marmorata* en los días a d) 49 días, último día en bioreactor, e) y f) 49 días listo para la siembra en charola y listos para aclimatar.

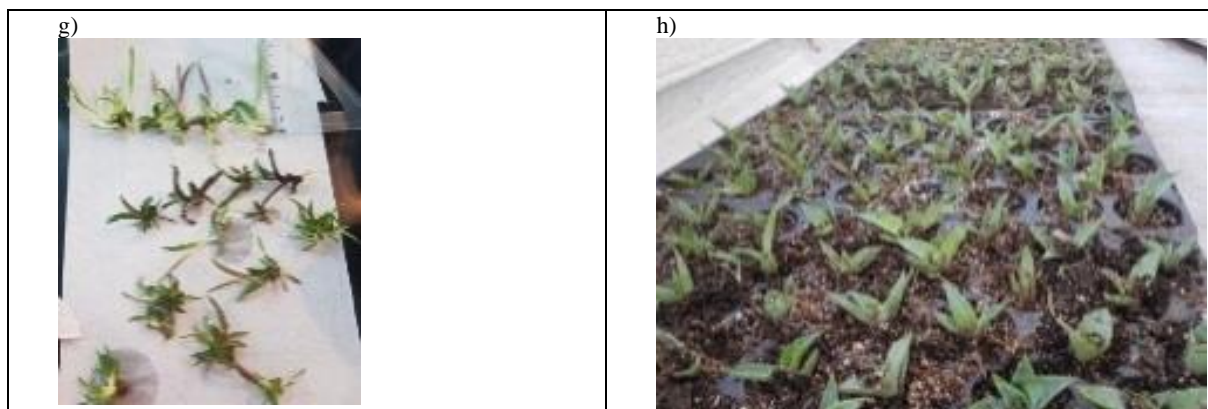


Figura 4. Evolución en el GreenTray® de *Agave marmorata* en los días g) 70 días (enraizamiento ex vitro) y h) 100 días (ex vitro)



Figura 5. Evolución de *Agave marmorata* en medio semisólido en los días a) 21 días y b) 49 días y enraizamiento a los 100 días (in vitro)

Diferencias significativas fueron observadas entre los diferentes tipos de micropropagación evaluados para el número de nuevas plántulas / plántulas iniciales a las 7 semanas de cultivo (Tabla 1). Se obtuvieron valores más altos en el GreenTray® que en el medio semisólido. En ambos métodos, la calidad de los brotes fue similar en términos de número de hojas (figura 4). Sin embargo, a longitud y el peso medio de las plántulas procedentes del GreenTray® fue significativamente más alto que el de las producidas en el medio semisólido (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de diferentes sistemas sobre la proliferación de brotes de *Agave marmorata* a las 7 semanas de cultivo.

Tipo de micropropagación	Nuevas plántulas/plántula inicial	Longitud de la plántula (cm)	Peso fresco por plántula (gramos)
Medio semisólido	4.333±0.554 b	2.292±0.234 b	0.621±0.074 b
GreenTray®	5.697±0.266 a	3.106±0.112 a	0.875±0.036 a

Los números representan la media ± SE (error estándar). Las medias con letras diferentes son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$)

Evaluación del GreenTray® en la fase de aclimatización

A las 4 semanas de cultivo en invernadero se observaron altas tasas de supervivencia en ambos sistemas de cultivo. El desarrollo de la raíz fue mejor cuando los explantes se trataron con auxina (IAA) (tabla 2 y figura 5).

Table 2. Porcentaje de supervivencia en plántulas

Variedad	PS %	PS % usando IAA
<i>Agave marmorata</i>	88	95.2

El Sistema GreenTray® utilizado para este estudio resultó adecuado para la producción en masa de agaves marmorata, ya que fue posible obtener plantas de mejor calidad y una tasa de supervivencia mayor que en el medio semisólido.

Al comparar la tasa de multiplicación en ambos sistemas, para el caso del sistema GreenTray® fue mayor que la del medio semisólido en un 30%, siendo estadísticamente significativo; como se detalla en la tabla 1. Este tipo de bioreactor es capaz de producir de 300 a 500 plántulas por cada bioreactor GreenTray®, mientras que en el medio que contiene agar (medio semisólido) en frascos de vidrio, se obtuvieron aproximadamente 100 brotes por contenedor.

Otra comparación que se realizó arrojó que en la longitud promedio de las nuevas plántulas fue 28% mayor en el biorreactor GreenTray® que en el medio semisólido con brotes producidos con la misma calidad en ambos sistemas, siendo estadísticamente significativa como se detalla en la tabla 1.

Cabe destacar la reducción en el tiempo requerido para obtener plantas, ya que es posible acortar en cuatro semanas la producción de plántulas de agave marmorata con la utilización de sistemas de inmersión temporal utilizando medios líquidos. La reducción del tiempo requerido para extraer las plántulas del contenedor GreenTray® es significativa, ya que basta con extraer la charola sin necesidad de pinzas, que son necesarias para el tarro de cristal. Las plántulas obtenidas en este Sistema no presentaron problemas de hiperhidricidad, algo muy recurrente en otros sistemas de inmersión temporal como el caso de RITA®. La hiperhidricidad es un desorden fisiológico que puede ocurrir en el cultivo de tejidos de las plantas en cualquiera de las etapas del cultivo y puede causar daños irreversibles en las células del tejido causando la muerte del explante.

En general, el análisis de los resultados de los sistemas de cultivo muestra que el biorreactor GreenTray® es estable y confiable y con una mayor productividad.

Conclusiones

Este trabajo de investigación se realizó con la finalidad de probar una nueva tecnología de reproducción masiva de agaves por la vía de la micropropagación; estos se utilizan principalmente en la elaboración de bebidas alcohólicas como el mezcal. Al validarla representará una alternativa que beneficiará a los viveristas y productores de este sector agroindustrial. Los resultados obtenidos representan una gran oportunidad para detonar la producción de agaves en zonas de muy alta marginación en un periodo corto de tiempo ya que con esta técnica se pueden obtener una gran cantidad de agaves en poco tiempo.

Los resultados de este estudio demostraron la utilidad del GreenTray® para la micropropagación del agave estudiado, obteniendo una mayor cantidad de plantas en un tiempo más corto, ocupando menos área de cámara por explante y reduciendo costos en mano de obra por manipulación de las plántulas. La alta tasa de supervivencia de las plántulas obtenida con este sistema aseguró el éxito del proceso de micropropagación ya que es posible eliminar la fase de enraizamiento in vitro.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos en otros estudios de micropropagación que utilizan sistemas de inmersión temporal de otras especies (Ramírez et al. 2016; Escolana et al. 1999, Bernal et al. 2008, Niemenak et al. 2008, 2013; Roels et al. 2005).

Uno de los principales inconvenientes del establecimiento de un protocolo de micropropagación en un sistema de inmersión temporal son las anomalías morfológicas y fisiológicas que se producen en los brotes y los explantes (Ruffoni y Savona 2013). En los sistemas de inmersión temporales, generalmente ocurren problemas de hiperhidricidad (Sreedhar et al. 2009), pero en nuestro biorreactor GreenTray® no se detectaron estos problemas, presumiblemente debido a la renovación del aire durante la evacuación completa del medio de cultivo.

Este trabajo sirve de base para el escalamiento para la producción en masa del *Agave marmorata* ya que con este sistema se pueden producir una gran cantidad de plantas con la calidad fitosanitaria necesaria, en un lapso de tiempo corto, en poco espacio y en cualquier época del año.

En general, el análisis de los resultados de los sistemas de cultivo muestra que el nuevo bioreactor es confiable y con mayor productividad que el cultivo en medios semisólidos

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por Madre Tierra Puebla S. de R.L. de C.V. y por el Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla (CONCYTEP). Agradecemos también a IRTA Fruitcentre, Laboratorio de Cultivo in Vitro de Plantas, Lleida, España, y a la Universidad Tecnológica de Tehuacán por su invaluable apoyo.

Referencias

- Aragón C.E., Sánchez C., González, Olmedo J., Escalona M., Carvalho L., Amancio S. Comparison of plantlets propagated in temporary immersion bioreactor and gelled medium during in vitro growth and acclimatization, 2014. *Biol Plant* 58:28-38
- Bernal A., Machado P., Cortegaza L., Carmona E.R., Rivero O., Zayas C.M., Nordaze O., Pérez A., Santana I., Arencibia A.D. Priming and biopriming integrated into the sugarcane micropropagation technology by Temporary Immersion Bioreactor (TIBS) 2008. *Sugar Tech* 10:42-7
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2011. *La Biodiversidad en Puebla: Estudio de Estado*. México.
- Escalona M., Lorenzo J.C., González B., Daquinta M., González J.L., Desjardins Y., Borroto C.G. Pineapple (Ananas comusus L. Merr) micropropagation in Temporary immersion system. 1999. *Plant Cell Rep.* 18:743-8
- Felipe A.J. Patrones para frutales de pepita y hueso. Ed. Técnicas Europeas 1989, Barcelona. España 181 p
- Etienne H., * & Berthouly M. Temporary immersion systems in plant micropropagation. 2002, 215–231,
- Watt M. The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. 2012, 14025-14035
- Welander M., Persson J., Asp H., Zhua L.H. Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation, 2014, 227–232
- Niemenak N., Noah A.M., Omokolo N.D. Micropropagation of cocoyam (Xanthosoma sagittifolium L Schott) in temporary immersion bioreactor. 2013. *Plant Biotechnol Rep* 7:383-90
- Niemenak N., Saare-Surminski K., Rohsius C., Omokolo N.D., Lieberei R. Regeneration of somatic embryos in Theobroma cacao L. in Temporary immersion bioreactor and analysis of free amino acids in different tissues. 2008 *Plant Cell Rep* 27:667-76
- Planeación Agrícola Nacional (2017-2030). *Agave Tequilero y mezcalero mexicano*. SAGARPA, 2017
- Pinochet J. Replantpac (Rootpack R) a Plum –almond hybrid rootstock for replant situation, 2010. *Hostsciencie*. 45. 299-301
- Ramírez Ma., Iglesias L. Evaluation of different temporary immersion system (BIT, BIG and RITA) in the micropropagation of Vanilla planifolia Jacks. 2016. *In Vitro Cell.Dev.Biol.* 52:154-160
- Robert M.L.I, Herrera, Herrera J.L., Herrera, Herrera G., Herrera, Alamillo M.A., Fuentes, Carrillo P. A new temporary immersion bioreactor system for micropropagation. 2006, 318:121-9
- Roels S., Savona M. Physiological and biochemical analysis of growth abnormalities associated with plant tissue culture. 2005. *Hort Environ Biotechnol* 54:191-205
- Steward F., Ammirato P., Mapes M. 1970. Growth and development of totipotent cells; some problems, procedures and perspectives. *Ann. Bot.* 34:761–787
- Georgiev V., Schumann A., Pavlov A., Bley T.. Temporary immersion systems in plant biotechnology. 2014, 607-621

Notas Biográficas

Carlos Rolando Mendoza Morales es Supervisor Escolar de Educación Superior de la Secretaría de Educación del Estado de Puebla. Es Investigador en el Fruitcentre, Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, Cataluña, España (IRTA). En México, es Investigador independiente en temas de Agricultura, ambiental y biotecnología, cuenta con una patente internacional y una nacional en sistemas de reproducción masiva de plantas por medio de micropropagación. Asesor de proyectos y negocios agroalimentarios y ecológicos en el Gobierno del Estado de Puebla, Colaborando con la SE, la SMNR, SADER, y particulares. Lidera una empresa dedicada a la Educación Ambiental, reproducción y comercialización de plantas mexicanas llamada “Madre Tierra”. Esta empresa cuenta con un laboratorio de reproducción vegetal de ornamentales y frutales. Realiza estudios sobre la aplicación de técnicas de tejidos vegetales orientadas a apoyar y acelerar los programas de mejora genética y de reproducción masiva de plantas, especialista en las siguientes áreas:

- Sistemas de Inmersión Temporal.- Desarrollo de prototipos SIT.
- Micropropagación.- Propagación de plantas, portainjertos o variedades seleccionadas, principalmente en árboles frutales. Cuenta con más de 50 protocolos de multiplicación.

- Cultivos celulares.- Generación, mantenimiento y producción de cultivos celulares a partir de diferentes partes y especies de plantas.

Desarrollo de agro negocios.- Escalamiento comercial de sistemas de micropropagación, diseño de cadenas productivas y de valor, planes de agronegocios.