



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Propagación *in vitro* de *Agave angustifolia*, *A. karwinskii* y
A. parrasana en sistemas de inmersión temporal (BITS)**

TESIS

Que presenta:

IBQ FANNY ELIDA NOLASCO JÁUREGUI

para optar por el grado de:

Maestra en Ciencias área Biotecnología Vegetal

TUTORES:

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

Aguascalientes, Ags., a diciembre de 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
Departamento de Química

FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
PRESENTE

Por medio de la presente, como cotutor designado de la estudiante **FANNY ELIDA NOLASCO JÁUREGUI**, con ID 128091, quien realizó la tesis titulada: "*Propagación in vitro de Agave angustifolia, A. karwinskii y A. parrasana en sistemas de inmersión temporal (BITs)*", y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 23 de noviembre de 2020.

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch
Cotutor de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



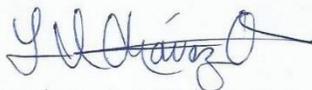
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
Decano del Centro de Ciencias Básicas
PRESENTE

Por medio de la presente, como cotutora designada de la estudiante **FANNY ELIDA NOLASCO JÁUREGUI**, con ID 128091, quien realizó la tesis titulada: "*Propagación in vitro de Agave angustifolia, A. karwinskii y A. parrasana en sistemas de inmersión temporal (BITS)*", y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 23 de noviembre de 2020.



Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz
Cotutora de Tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Química
c.c.p.- Consejero Académico
c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
PRESENTE

Por medio del presente como ASESORA designada de la estudiante FANNY ELIDA NOLASCO JÁUREGUI, con ID 128091, quien realizó la tesis titulada: "PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE AGAVE ANGUSTIFOLIA, A. KARWINSKII Y A. PARRASANA EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL (BITS)", un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y son otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 26 de noviembre de 2020.


Dra. Yenny Adriana GÓMEZ Aguirre
Asesora de Tesis

c.c.p. Interesado
c.c.p. Secretaría de Investigación y Posgrado
c.c.p. Jefatura del Depto. De Química
c.c.p. Consejero Académico
c.c.p. Minuta Secretario Técnico

NOMBRE: FANNY ELIDA NOLASCO JÁUREGUI ID 128091

PROGRAMA: Maestría en Ciencias, área Biotecnología Vegetal o Toxicología LGAC (del posgrado): Biotecnología Vegetal

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TITULO: Propagación in vitro de *Agave angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. parrasana* en sistemas de inmersión temporal (BITs).

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Se desarrolló tecnología para la propagación masiva de tres especies de *Agave* muy importantes en lo que respecta a su aprovechamiento, pero vulnerables debido a su sobreexplotación. Esta tecnología podría permitir su explotación sostenible.

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>	
SI	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
N.A.	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>	
SI	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
N.A.	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI	Coincide con el título y objetivo registrado
SI	Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI	Tiene el CVU del Conacyt actualizado
N.A.	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<i>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</i>	
	Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
	El estudiante es el primer autor
	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
	La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado: Sí X
No _____

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:


Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:


Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:


Dra. Haydee Martínez Ruvalcaba

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:


M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme cumplir esta meta en mi vida.

A CONACYT por haberme apoyado con los recursos necesarios a través de la beca 904050, sin la cual no se hubiera llevado a cabo este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes, mi *Alma Máter*, por darme la oportunidad de realizar este Posgrado en dicha institución, brindándome magníficos profesores e investigadores.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch, por confiar en mí, por guiarme a lo largo del proyecto y durante las clases impartidas.

A la Dra. Lucía Isabel Chávez Ortiz por su infinita paciencia, conocimiento, apoyo y voluntad para orientarme. Mi más sincero respeto y admiración.

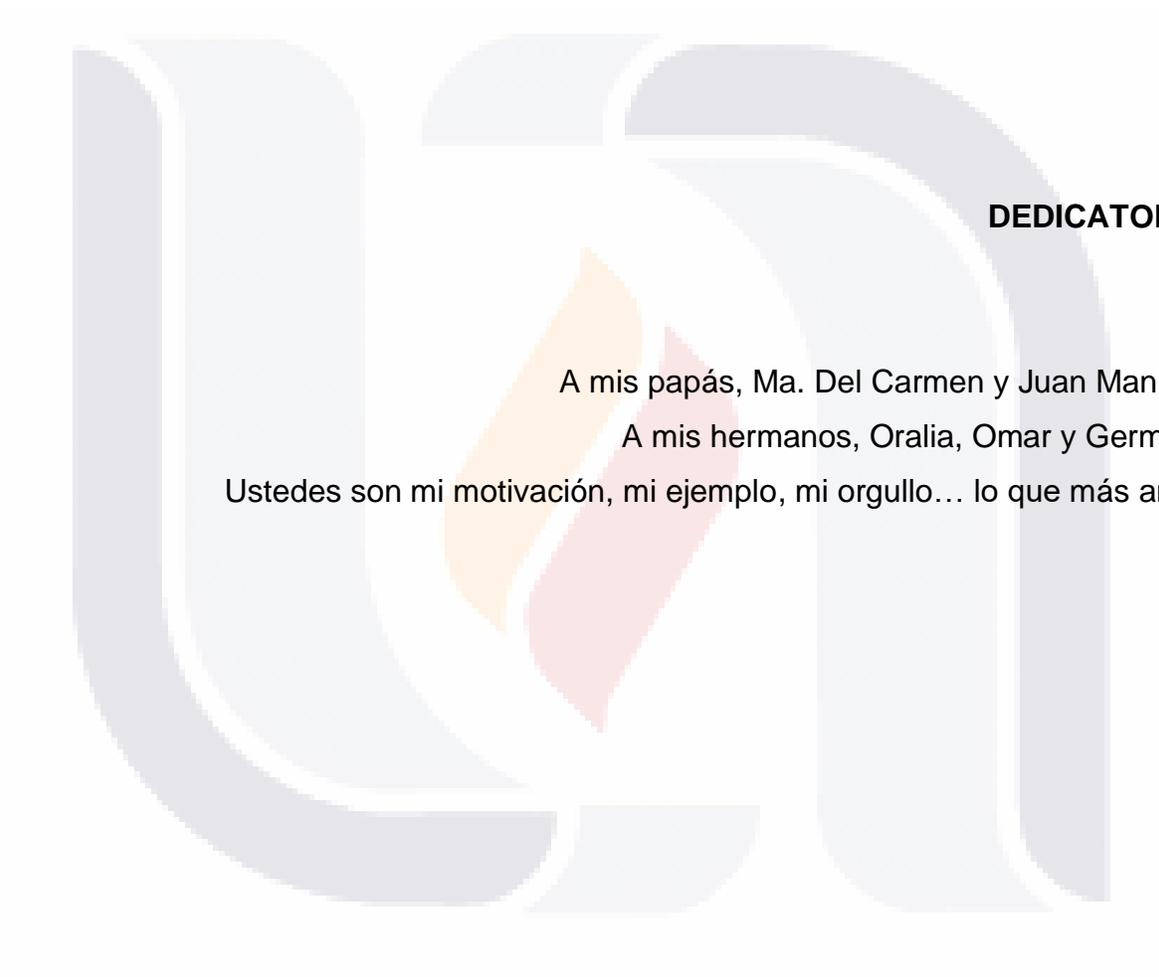
A la Dra. Yenny Adriana Gómez Aguirre, por inspirarme a siempre dar ese plus en todo lo que haga y su valiosa contribución para la realización de este proyecto de tesis.

A la Unidad de Biotecnología Vegetal, por brindarme no solo sus instalaciones, materiales y equipos, sino también a todos sus miembros, por compartirme su conocimiento, compañía y recomendaciones.

A Los Chidos y todos mis amigos del posgrado y la ingeniería, gracias por tanto apoyo y tantos buenos momentos.

A todas las personas que de alguna u otra manera contribuyeron en este proyecto.

A todos lo que dudaron de mí, por impulsarme a mejorar.



DEDICATORIA

A mis papás, Ma. Del Carmen y Juan Manuel.
A mis hermanos, Oralia, Omar y Germán.
Ustedes son mi motivación, mi ejemplo, mi orgullo... lo que más amo.

ÍNDICE GENERAL

	CONTENIDO	Pág.
	RESUMEN	8
	ABSTRACT	9
1	INTRODUCCIÓN.	10
2	ANTECEDENTES.	11
	2.1 Género Agave.	11
	2.1.1 <i>Agave angustifolia</i> . Haw.	13
	2.1.2 <i>Agave karwinskii</i> . Zucc.	15
	2.1.3 <i>Agave parrasana</i> .A. Berger.	17
	2.2 Sistemas de propagación <i>in vitro</i> en plantas.	18
	2.2.1 Medio semisólido.	20
	2.2.2 Medio líquido.	20
	2.2.3 Sistemas de inmersión temporal en biorreactores.	21
	2.3 Antecedentes sobre el cultivo y propagación <i>in vitro</i> de agaves.	23
3	JUSTIFICACIÓN.	26
4	HIPÓTESIS.	26
5	OBJETIVOS.	27
	5.1 Objetivo general.	
	5.2 Objetivos específicos.	
6	METODOLOGÍA	28
	6.1 Propagar <i>in vitro</i> en medio semisólido las especies <i>A. angustifolia</i> , <i>A. karwinskii</i> y <i>A. parrasana</i> .	28
	6.1.1 Preparación del medio de cultivo MS.	28
	6.2 Establecer el protocolo para su propagación en medio líquido con la técnica de biorreactores de inmersión temporal (BITs), de las especies ya mencionadas.	29
	6.2.1 Preparación del medio de cultivo MS.	29
	6.2.2 Construcción de los sistemas de biorreactores de inmersión temporal (BITs).	29

6.2.3	Enraizamiento.	32
6.2.4	Adaptación a condiciones <i>ex vitro</i> .	33
6.3	Modificar algunos aspectos del diseño de los sistemas de inmersión temporal con el fin de optimizar su funcionamiento con cada una de las especies trabajadas.	33
6.3.1	Preparación del medio de cultivo MS.	34
6.3.2	Construcción de los sistemas de biorreactores de inmersión temporal modificados.	34
7	RESULTADOS	38
7.1	Propagar <i>in vitro</i> en medio semisólido las especies <i>A. angustifolia</i> , <i>A. karwinskii</i> y <i>A. parrasana</i> .	38
7.2	Establecer el protocolo para su propagación en medio líquido con la técnica de biorreactores de inmersión temporal (BITs), de las especies ya mencionadas”.	41
7.2.1	Enraizamiento.	48
7.2.2	Adaptación a condiciones <i>ex vitro</i> .	
7.3	Modificar algunos aspectos del diseño de los sistemas de inmersión temporal con el fin de optimizar su funcionamiento con cada una de las especies trabajadas.	52
8	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	57
9	CONCLUSIONES.	64
10	BIBLIOGRAFÍA.	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Pág.
1	Estadísticas descriptivas del número de brotes por especie.	39
2	Estadísticas descriptivas del número de brotes por explante por especie en biorreactores con medio líquido.	42



ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.	Descripción	Pág.
1	Se muestra ejemplar de <i>A. angustifolia</i> localizado en Campus Central de la UAA.	15
2	<i>A. karwinskii</i> : A) ejemplar con tallo desarrollado, localizado en zona arqueológica de Lambityeco, Oax. B) Ejemplar aun sin la madurez necesaria para desarrollar tallo, Campus Central UAA.	16
3	<i>A. parrasana</i> (Rodríguez, M; 2019, “un miembro de magueyes, yucas y parientes”. https://www.naturalista.mx/taxa/206956-Agave-parrasana/browse_photos).	18
4	Muestra de los cortes necesarios para obtener explantes basales de una plántula (Ontiveros, 2013).	28
5	Biorreactor de tipo Tanques Gemelos; se observan algunos de los materiales y piezas utilizadas en el armado de los biorreactores de inmersión temporal del tipo tanques gemelos.	30
6	Biorreactores de Inmersión Temporal: Montaje completo de biorreactores de tanques gemelos, ya con filtros.	31
7	Sistema de Inmersión Temporal con medio de cultivo estéril colocado en plataforma.	32
8	A) Conector tipo pasamuros neumático de latón, utilizado para los BITs modificados. B) llave de tres vías neumática.	35
9	Sistema de inmersión temporal modificado armado con explantes de la especie <i>A. angustifolia</i> y medio de cultivo estéril.	36
10	Ejemplares de sistemas de biorreactores de Inmersión Temporal modificado conectado completamente a las bombas y temporizadores, ya en funcionamiento.	36

11	Porcentaje de explantes que presentaron crecimiento y presencia de brotes de las tres especies (<i>A. parrasana</i> , <i>A. karwinskii</i> y <i>A. angustifolia</i>) en medio semisólido.	39
12	A) material vegetal de <i>A. angustifolia</i> donado por el Banco de Germoplasma. B) explantes de <i>A. angustifolia</i> después de un mes en medio para propagación.	40
13	<i>A. karwinskii</i> en medio semisólido: A) Material vegetal donado por el Banco de Germoplasma de la Unidad de Biotecnología Vegetal. B) <i>A. karwinskii</i> después de tres meses de haber sido micropropagado.	40
14	<i>A. parrasana</i> en medio semisólido: A) Material donado por Banco de Germoplasma. B) Explantes después de una semana en medio de propagación. C) Explantes después de tres meses en medio de propagación.	41
15	Tipos de respuesta desarrolladas en los biorreactores de inmersión temporal <i>A. angustifolia</i> , <i>A. karwinskii</i> y <i>A. parrasana</i> .	43
16	Comparación de número de brotes promedio obtenidos por especie en medio semisólido (rojo) y medio líquido (azul).	44
17	Se muestra la especie <i>A. angustifolia</i> en diferentes etapas del proceso de micropropagación en medio líquido en biorreactores; A) Explantes antes de ser colocados dentro del biorreactor. B) Explantes después de dos semanas dentro del sistema de Inmersión Temporal. C) explantes con brotes después de tres meses en el sistema de inmersión temporal. D) brotes con vitrificación. E) Sistema de Biorreactores con filtros dentro de campana de extracción para sacar explantes y realizar conteo de brotes después de 90 días en Inmersión Temporal.	45
18	Se muestra a <i>A. karwinskii</i> durante diferentes etapas de la propagación <i>in vitro</i> en medio líquido por la técnica de Tanques Gemelos; A) antes de obtener los explantes basales para ser colocados en medio de cultivo para inmersión permanente (solo 3 días). B) Explantes después de 3 semanas en Inmersión temporal. C) plántulas después de tres meses dentro del	46

	biorreactor de inmersión temporal. D) explante con crecimiento múltiple de brotes.	
19	Se muestra a la especie <i>A. parrasana</i> durante diferentes etapas de la propagación in vitro en medio líquido a partir de la técnica de Tanques Gemelos; A) en sistema de inmersión temporal después de un mes. B) Sistema de Biorreactores en plataforma en uso; C) y D) plántulas después de 3 meses dentro del sistema de biorreactores, presentan diferenciación de espinas y raíces; E) brotes obtenidos en biorreactor, se muestran vitrificación, además de masa de brotes poco diferenciados.	47
20	Porcentaje (%) de explantes que presentaron crecimiento de raíces de las tres especies (<i>A. parrasana</i> , <i>A. karwinskii</i> y <i>A. angustifolia</i>) en medio semisólido.	49
21	<i>A. angustifolia</i> luego de haber estado 60 días en el medio MS para enraizamiento.	50
22	Se muestran ejemplares luego de permanecer en medio para enraizamiento (A), así como la comparación de explantes sin proceso de enraizamiento (arriba) y después de haber pasado 60 días en medio MS semisólido para enraizamiento (abajo) (B).	50
23	Se muestran plántulas en el proceso de adaptación a condiciones <i>ex vitro</i> : A) y B) plántulas de <i>A. parrasana</i> después de ser sacadas del enraizador y siendo colocadas en la mezcla de sustratos. C) ejemplar de <i>A. parrasana</i> luego de haber sido adaptada y colocada en invernadero. D) planta de <i>A. karwinskii</i> ya adaptada y colocada dentro de invernadero sin bolsas para adaptación de humedad.	52
24	Resultados de los tres sistemas para la especie <i>A. angustifolia</i> . Las líneas de error muestran el rango intercuartil, las barras son las medianas (ANOVA no paramétrica) y las líneas muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba Dunn ($P < 0.005$); existen diferencias significativas entre el medio MS semisólido y el sistema BIT modificados, así como entre BITs y BITs modificado.	53

25 Se muestra los tipos y frecuencia de respuesta obtenidas en biorreactores de Inmersión Temporal modificados para *A. angustifolia*. 54

26 Se presenta Biorreactores de Inmersión Temporal modificado armado completamente y en funcionamiento, con explantes y medio de cultivo. B) y C) ejemplos de biorreactores con canica en la base del recipiente, así como explantes dentro, además de observarse los conectores tipo pasamuros neumático recto de latón con recubrimiento de níquel de 6 mm. D) frascos con canicas y explantes al final del proceso de Inmersión Temporal, a punto de ser sacados para conteo de brotes. 55

27 Se muestran plántulas de *A. angustifolia* después del proceso de micropropagación en medio líquido, así como algunos tipos de respuesta; A) Comparación de los diferentes tipos de respuestas presentadas en este tipo de sistemas de Inmersión Temporal modificado. B) Ejemplares con resultados positivos, es decir, múltiples brotes, presencia de raíces, hojas sanas y vigorosas y espinas diferenciadas. C) Ejemplares donde se tiene la base y algunas de las hojas con hiperhidratación. D) ejemplar donde observa la presencia de raíces. E) ejemplar con brotes, después del periodo de Inmersión Temporal, donde puede observarse el daño en una de las hojas, muy posiblemente debido a cizallamiento. 56

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Propagación *in vitro* de *Agave angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. parrasana* en sistemas de inmersión temporal (BITs).

Fanny Elida Nolasco Jáuregui.

RESUMEN

La importancia de los agaves en México se ve reflejado en varios aspectos, desde lo ecológico y alimentario hasta lo económico. Siendo su uso más conocido la producción de bebidas alcohólicas como el tequila y el mezcal. Solo en 2018, se produjeron 5.9 millones de litros de mezcal, de los cuales 3.5 fueron exclusivos para exportaciones. Consumo que genera una sobredemanda, derivando en amenaza de varias especies. La Biotecnología ofrece técnicas como la micropropagación que puede garantizar la producción de las plantas requeridas, así como la conservación de las especies al evitar la explotación de material silvestre. Es por lo que, en este trabajo se establecieron protocolos de propagación en medio semisólido y medio líquido utilizando Sistemas de Biorreactores de Inmersión Temporal (BITs) de tipo tanques gemelos, así como la modificación de ellos buscando aumentar el promedio de brotes, para las especies de *Agave angustifolia*, *Agave karwinskii* y *Agave parrasana*. Se usó medio de Murashige y Skoog (MS), enriquecido con Benciladenina (BA) (1 mg L⁻¹ para *A. angustifolia* y *A. parrasana*, 2 mg L⁻¹ para *A. karwinskii*), obteniendo un mayor promedio de brotes con el explante para *A. karwinskii* en medio semisólido y líquido (7.24 y 10.02, respectivamente). En los biorreactores se usaron fotoperiodos de 16:8h, e inmersiones de un minuto cada 12 horas, alcanzando un incremento en los brotes obtenidos para las tres especies (5.12, 10.02 y 7.54), además de un notable desarrollo de raíces en *A. parrasana*, favoreciendo así su adaptación a condiciones *ex vitro*. *A. angustifolia* fue la única especie propagada en los tres tipos de sistemas: medio semisólido (2.38), BITs (5.12) y BITs modificados (4.90); presentando incremento en los brotes por explante con respecto al medio MS, demostrando la eficiencia del uso de biorreactores. En los biorreactores modificados se tuvieron periodos de hasta 89 días adicionales, y se presentó necrosis, vitrificación y tejido calloso.

Palabras clave: *Agave*, benciladenina, inmersión temporal, medio líquido, micropropagación.

***In vitro* propagation of *Agave angustifolia*, *A. karwinskii* and *A. parrasana* using temporary immersion bioreactors (TIBs).**

Fanny Elida Nolasco Jáuregui.

ABSTRACT

The importance of agaves in México is reflected in several aspects, from such as ecological and gastronomy/food to production and economic. Its use is better known as the production of alcoholic beverages such as tequila and mezcal. In 2018 alone, 5.9 million litres of mezcal were produced, of which 3.5 were exclusively for exports. This consumption has generated an over-demand, therefore driving some species to become endangered. Biotechnology offers techniques such as micropropagation to aid in their preservation. That is why, in this work, propagation protocols were established in semi-solid and liquid mediums using Temporary Immersion Bioreactor Systems (TIBs) type twin tanks, as well as modifying them looking to increase the average of buds, for the species of *Agave angustifolia*, *Agave karwinskii* and *Agave parrasana*. Murashige and Skoog medium (MS) enriched with Benzyladenine (BA) (1 mg L^{-1} for *A. angustifolia* and *A. parrasana*, 2 mg L^{-1} for *A. karwinskii*), obtaining the highest average of shoots per explant with *A. karwinskii* in semi-solid and liquid medium (7.24 and 10.02, respectively). In bioreactors, photoperiods of 16: 8h, and immersion time of 1 min every 12 hours were used, obtaining an increase in the shoots for the three species (5.12, 10.02 and 7.54), in addition, a substantial development of roots in *A. parrasana*. Thus, increasing the adaptation to *ex vitro* conditions. *A. angustifolia* was the only species propagated in the three types of systems (semi-solid medium, TIBs and modified TIBs); showing an increase in shoots per explant comparing with the MS medium, demonstrating the efficiency of the bioreactors (2.38, 5.12 and 4.90, respectively). In modified bioreactors, periods of up to 89 additional days were applied and necrosis, vitrification, and callus tissue occurred.

Key words: *Agave*, benzyladenine, liquid medium, micropropagation, temporary immersion.

1. INTRODUCCIÓN

Los agaves son un grupo vegetal ampliamente estudiado. Son plantas conocidas no solo por su succulencia, sino por el rol que desarrollaron en diversas civilizaciones en América debido su importancia económica y cultural entre los pueblos indígenas que los utilizaron por mucho tiempo como alimento, ornato, fibras, bebidas, entre muchos otros usos. Su distribución abarca el sur de Estados Unidos, Centroamérica y el norte de Suramérica incluyendo las islas del Caribe. El género *Agave* tiene aproximadamente 200 especies, de las cuales 150 se encuentran en México, lo que corresponde al 75%, de las cuales 129 son endémicas, siendo así el país con mayor diversidad del género. Los agaves se encuentran distribuidos de forma poco uniforme en territorio mexicano, siendo las zonas áridas o semiáridas las privilegiadas en donde se encuentran mayor cantidad de especies, como lo son las serranías Meridionales del centro de México, la Sierra Madre Occidental, el Altiplano Mexicano, la Península de Baja California y la Sierra Madre Oriental (Gentry, 1982; Colunga-García & May-Pat, 1997; Colunga-García *et al*, 2007; García-Mendoza, 2007; García-Mendoza *et al*, 2019).

Los agaves pueden reproducirse de manera sexual y asexual, la primera es a partir de la polinización esto debido a murciélagos nectarívoros o insectos y aves. Por otro lado, en la reproducción asexual, que es la manera principal de propagación natural, en la cual se generan clones o hijuelos en diferentes partes de la roseta o inflorescencia. Aunque algunas especies de *Agave* carecen de la capacidad de reproducirse asexualmente, por lo que la reproducción sexual por semilla es su única vía de propagación. Sin embargo, independientemente de cuál sea la forma de reproducción se caracteriza por tener gran vulnerabilidad, lo cual limita sus reservas y en rara ocasión las plántulas crecen y maduran (García-Mendoza, 2007; Villaseñor, 2016).

Debido a lo anterior, se han buscado opciones como la micropropagación, cuyo proceso es a partir de la selección de un explante aislado y desinfectado al cual se le brindan condiciones óptimas para su crecimiento y generación de plantas nuevas conservando sus características genéticas; dado que la multiplicación es rápida y a gran escala, se obtienen beneficios en ahorro de tiempo e inversión. Las opciones son varias, la más ampliamente utilizada es el medio semisólido; aunque se han estado implementando nuevas técnicas como lo es la inmersión temporal en medio líquido, siendo una de ellas el uso de biorreactores y resulta en un mayor índice de multiplicación y un desarrollo mejor de los explantes (Miguel-Luna *et al*, 2013).

2. ANTECEDENTES

2.1 Género *Agave*.

En 1753, Carlos Linneo fue el primero en describir el género *Agave*, perteneciente a la familia *Asparagaceae*, el cual incluye alrededor de 200 especies adaptadas a regiones áridas y semiáridas, nativas de América, pero distribuidas ya en diferentes zonas del planeta. Son plantas del tipo perenne, cuyas hojas se disponen en espiral y en roseta, cuyo ápice puede ser de diferente longitud dependiendo de la especie, pudiendo ser de algunos centímetros hasta tres metros de altura. Sus hojas son suculentas, fibrosas, carnosas, con forma alargada u ovalada (Colunga-García & May-Pat, 1997; García-Mendoza, 2007; Pérez *et al*, 2012).

De igual manera, el número de hojas varía de una especie a otra, pudiendo ser desde 5 o 10 en algunas especies como en *Agave gypsophila* o de hasta 200 para el *Agave rhodacantha*. El desarrollo de la suculencia de sus hojas es el resultado de la adaptación debido a la restricción en las cantidades de agua disponible y almacenada durante la época de lluvia, la cual es escasa al desarrollarse en regiones áridas. Las hojas presentan una espina al final del ápice, y a los márgenes de las hojas sobresalen dientes córneos debido a proyecciones de tejido o bien, dientes pequeños. El color de los agaves varía desde tonos verdes o amarillos hasta rojizos y violetas (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2007, 2010; García-Mendoza *et al*, 2019).

Con respecto a la raíz, los agaves cuentan con un sistema superficial para facilitar la absorción de agua, la cual, debido a la escasez solamente se encuentra de manera superficial, debido a ello se almacena toda la cantidad posible para las prolongadas sequías a las cuales se expone la planta; así, el agua que se almacenó se utiliza para funciones bioquímicas y la apertura de estomas (García-Mendoza, 2003, 2007; Barrientos-Rivera *et al*, 2019).

El maguey o agave ha sido representativo de México desde épocas muy remotas, su importancia económica radica en que de las 150 especies encontradas en México aproximadamente 75 son aptas para uso directo como alimento humano, y obtención de bebidas, fibras, medicamentos. Su uso se remonta a culturas prehispánicas de América del Norte, donde los indígenas de la costa del Pacífico mexicano (desde Sonora hasta Oaxaca), frecuentemente elaboraban bebidas fermentadas a partir del agave. Posteriormente, con La Conquista Española

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

al continente, y la introducción de la destilación, practicada por los misioneros españoles en el siglo XVI, se dio paso a los destilados de agave sustituyendo los fermentados, siendo los más prolíferos hasta nuestros tiempos el tequila, el mezcal y la bacanora (Colunga-García *et al*, 2007; García-Mendoza, 2007, 2010; Monja-Mío *et al*, 2015).

De igual manera representan un apoyo destacado para la sustentabilidad ecológica del medio ambiente, dados los cambios que se han presentado debido a situaciones del cambio climático global, donde la elevación notable de la temperatura ambiental extrema reduce la disponibilidad del agua en el ambiente, siendo los agaves, además de las cactáceas, la opción ideal favorable debido a sus ya citadas multitareas en la sociedad, además de ser usados por agricultores como terrazas y bordes para evitar escurrimientos de agua y el control de la pérdida de suelo debido a la erosión edáfica (Colunga-García *et al*, 2007).

Existen muchas especies que se encuentran en peligro debido a la alta demanda de productos que de los agaves se obtienen, un ejemplo de ello es la producción de tequila y mezcal que se ha dado de forma exponencial en los últimos años; de acuerdo con la Secretaría de Economía (2016), las exportaciones de mezcal han incrementado en un 322% anual del año 2012 al 2015; de 22, 325 litros a 2, 076, 624 litros; denotando así la importancia en el sector productivo como motor económico que representan los agaves en el país; al mismo tiempo que los datos anteriores solo son para el mencionado mezcal, aun faltaría considerar el aporte en otros diversos usos, que si bien, algunas especies no se encuentran en amenaza, sí aportan a la economía nacional, derivándose entonces su demanda y consumo (SEMARNAT, 2010; Vázquez-Elorza, 2019).

Siendo conscientes de la demanda y consumo actual de las diferentes especies de agave en el país surge este proyecto, pues la diversidad de los agaves de México y sus poblaciones silvestres deben ser conservadas, pues son resultado del proceso mismo de selección natural desde hace miles de años, obteniendo productos tradicionales nativos y endémicos de sus respectivas regiones convirtiéndolas así en patrimonio de la cultura mexicana. También se debe recordar que los agaves al ser plantas altamente productoras de biomasa con un consumo de agua mínimo, atrapan dióxido de carbono a lo largo del día, contribuyendo así a contrarrestar en alguna cantidad el cambio climático actual.

En este proyecto se han seleccionado tres especies, las cuales son *Agave angustifolia*, ampliamente distribuido en el territorio nacional y usado para la producción de mezcal en varias regiones del país, así como bacanora en el estado de Sonora; *Agave karwinskii* del cual se obtiene principalmente mezcal en los estados de Oaxaca y Puebla; y, *Agave parrasana* conocida por su uso ornamental.

2.1.1 *Agave angustifolia* Haw.

Su nombre científico proviene del latín “*angustus*” (estrecho) y “*folia*” (hoja), haciendo referencia a la anchura de sus hojas, siendo el nombre común más popular “espadín”. Presenta una distribución geográfica amplia desde Norteamérica, Costa Rica, la costa Atlántica y del Pacífico, Tamaulipas y Noroeste de Sonora; también es común encontrarla en Nicaragua, además de ser una de las primeras especies conocidas e introducidas en Europa; puede localizarse en costas, bosques caducifolios, tropicales y subcaducifolios, dunas costeras y cultivos abandonados, y, son dichas diferencias en los suelos y climas, adaptaciones, dispersiones de semillas e interacciones con el medio ambiente al que se adaptan que favorecen la diversidad de taxones (García-Mendoza, 1995; Guillot *et al*, 2009; Barrientos-Rivera *et al*, 2019).

Wijnands (1983) y Forster (1986) aseguraron que, *A. angustifolia* y *A. vivípara* son especies sinónimas, argumentando la considerable diversidad morfológica y capacidad de adaptación que presenta dicha especie en particular. A pesar de la falta de límites bien establecidos dentro de la familia *Asparagaceae*, múltiples estudios han demostrado que, dichas especies si bien tienen algunas características similares no son sinónimas. Y, a pesar de que la respuesta al tipo de suelo y la interacción con el medio ambiente influye directamente en los agaves, dichas especies ni siquiera se traslapan en alguna área (Linneo, 1753; APG IV, 2016; Barrientos-Rivera *et al*, 2019; García-Mendoza, 2019).

Es importante mencionar que ambos autores (Wijnands y Forster), establecieron la mayoría de sus investigaciones y estudios en Australia y Europa, donde no hay agaves nativos, mientras que en México la taxonomía aceptada se ha basado en trabajos previos realizados por

García-Mendoza, quien a su vez se apoya en la clasificación estipulada por Gentry en 1982, la cual ha sido el mayor estudio registrado específicamente en agaves en América.

A. angustifolia se caracteriza por tener rosetas pequeñas, compactas y simples; presentan tallos con longitud de 20 a 60 cm. Tiene hojas de color verde claro a gris glauco de 20-30 cm x 10-12 cm, cercanas entre sí, tienen forma ovalada, planas y cóncavas en la parte superior, convexas en la inferior, rígidas y frecuentemente presentan líneas grises; los dientes que presentan son en su mayoría pequeños de 2-5 mm de longitud, los cuales se distribuyen a lo largo de la hoja, presenta una espina variable de 1.5 a 3.5 cm de longitud, cónica, marrón oscura colocada en la parte superior de la hoja (Gentry, 1982; Guillot *et al*, 2009; Us-Camas *et al*, 2017).

Su inflorescencia es paniculada, presenta ramas extendidas horizontalmente, tiene un pedúnculo compacto y bracteolado; sus flores son rojas o moradas, al abrirse presentan color amarillo, miden entre 50-60 mm de largo, sus ovarios son de 25-30 mm de largo constituidos por un cuello corto, un túbulo cilíndrico de 13-14 mm de profundidad, ligeramente hueco, sus tépalos son de 15 x 5-6 mm, amarillo pálido; siendo su periodo de floración entre marzo y diciembre. Sus filamentos son de 45-50 mm largos, erectos e insertados cerca del tubo medio, sus anteras miden 18-19 mm son amarillas y se encuentra en el centro. Por lo tanto, las cápsulas y las semillas no son visibles (Gentry, 1982; Guillot *et al*, 2009).

Tiene una distribución importante en toda América; según Ríos-Ramírez *et al* (2018) es la especie de mayor importancia económica en México y ocupa el 77.4% de la superficie cultivada de agaves en el estado de Oaxaca, reconocido por ser pionero en la producción de mezcal tanto para consumo nacional como para exportación. Tan solo en 2014, se produjeron 2.7 millones de litros de mezcal de los cuales 96.1% se destinó a la exportación dejando una derrama económica de 8.9 millones de dólares.



Figura 1: Se muestra ejemplar de *A. angustifolia* localizado en Campus Central de la UAA.

2.1.2 *Agave karwinskii* Zucc.

Esta especie es conocida por la altura de su tallo, la cual puede ser de hasta 2-3 metros; presenta hojas y flores pequeñas. Las hojas son coronas de 65-40 x 7-3 cm, lineares, cóncavas en el haz, son estrechas y engrosadas en la base. Presenta dientes marrón oscuro a lo largo de la hoja la cual puede llegar a medir de 3 a 5 mm de largo, son piramidales; cuando presenta espinas pueden medir desde 1.5 hasta 4 cm de largo, suelen ser cónicas con base engrosada, decurrente o no decurrente cuyo color va en una gama desde el marrón oscuro al grisáceo, su inflorescencia miden entre 3 a 3.5 mm de largo, presentando 10 a 15 ramas en el tercio superior del vástago; sus flores son pequeñas y verdosas o amarillo claro, presenta tépalos de 45 a 57 mm de largo, ovario de 20-30 mm de largo (Gentry, 1982; Guillot *et al*, 2009).

Tiene un crecimiento xerofito espontáneo solamente en regiones áridas del sureste. Puebla, Oaxaca, México y Veracruz en altitudes de 1550-1850 (snm), los tipos de hojas provenientes del área de Tehuacán muestran una espina terminal distintiva, mientras la nativa de Mitla puede no presentarla (Gentry, 1982).



Figura 2: *A. karwinskii*: A) ejemplar con tallo desarrollado, localizado en zona arqueológica de Lambityeco, Oax. B) Ejemplar aun sin la madurez necesaria para desarrollar tallo, Campus Central UAA.

2.1.3 *Agave parrasana* A. Berger.

El *A. parrasana* solo se encuentra en algunas montañas calizas en el sureste de Coahuila. Crece entre 4500 y 8000 pies de altura, principalmente asociada con chaparrales y comunidades de pino propios del desierto. Es una especie cuya roseta presenta surcos y el crecimiento es radial, sus hojas miden entre 20 y 30 cm de largo, de 10 a 12 cm de ancho, pueden ser de planas a cóncavas, cuya gama de color va de gris glauco a glauco azulado, además de ser carnosas, rígidas y fibrosas; cuenta con dientes marginales grandes cerca del ápice y disminuyen su tamaño mientras se acercan a la base, los dientes pueden ser rectos a curvados de color pardo grisáceo. Sus inflorescencias son paniculadas de 3 a 4 cm de alto, cuyas flores miden de 50 a 60 mm de longitud, cuyos tintes son rojos a púrpura en botón y cambia a amarillo al abrir. Dicha especie es fácil de distinguir ya que sus hojas se encuentran acuminadas, son cortas y anchas. En su región nativa es llamada "Noah"; debido a su resistencia al frío, tamaño moderado, la distintiva forma de las hojas y su coloración es demandada para uso ornamental para jardines (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2003).

A. parrasana es una especie endémica de Coahuila, México; sin embargo, al ser una planta suculenta ornamental debido a la forma característica de sus hojas y colores es altamente sobreexplotada; aunado a ello, la destrucción de hábitat y considerando su maduración tan prolongada (20 años a partir de semillas), ha resultado en una reducción altamente significativa en su hábitat nativo considerándola como una especie sujeta a protección especial en la Norma Oficial Mexicana de Protección Ambiental (Valiente-Banuet *et al*, 1991; Santacruz *et al*, 1999; SEMARNAT, 2010).



Figura 3: *A. parrasana* (Rodríguez, M; 2019, “un miembro de magueyes, yucas y parientes”. https://www.naturalista.mx/taxa/206956-Agave-parrasana/browse_photos).

2.2 Sistemas de propagación *in vitro* de plantas.

La micropropagación o propagación *in vitro*, es un proceso donde se desarrollan técnicas en las que se selecciona un explante, el cual se desinfecta, se aísla en condiciones controladas y de esterilidad donde exprese su totipotencialidad, conservando sus características genéticas, obteniendo como resultado múltiples plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, entre otros (Rocano, 2018).

Para llevarse a cabo, es necesario una serie de pasos a seguir, comenzando con la selección de las plantas madre, las cuales deberán cumplir las condiciones de calidad que permitan clones apropiados. Esta reproducción del tipo asexual se caracteriza por la propagación en invernadero por la asepsia proporcionada evitando las enfermedades que conlleva reproducción vegetal; sin embargo, también presenta limitaciones debidas principalmente a la variabilidad genética de las especies a tratar, altos costos en capacitación de personal, así como de los lugares donde se mantendrán en condiciones óptimas a los cultivos, de igual manera se debe llevar a cabo a partir de explantes o hijuelos jóvenes ya sea de semilla o plántula (Ziv, 1991; Ziv, 1995; Rocano, 2018).

A pesar de su creciente demanda se han observado limitantes como mutaciones en las plantas propagadas, pérdida de material por contaminación ya sea interna o externa, vitrificación y oxidación fenólica; también figuran los costos elevados del material utilizado. De acuerdo con la naturaleza física del medio se dividen en tres: semisólido, líquido y en sistemas de inmersión temporal (Rocano, 2018).

Debergh & Zimmerman (1991) mencionan que para que la micropropagación sea exitosa evadiendo los diferentes aspectos negativos mencionados anteriormente, se deben cumplir algunos aspectos básicos:

1. Una selección adecuada del material vegetal, es decir, establecer cuál será la parte de la planta a partir de la que se dará la propagación, pudiendo ser explante basal, hoja, semilla, entre otros. A partir de ahí es que se establece el protocolo o procedimiento a desarrollar pues debe comenzar con la reducción, limpieza de la “planta madre” o fuente de material vegetal; este paso es muy importante sobre todo si se va a trabajar a partir de semillas, pues su estructura externa y el contacto con sustratos puede presentar contaminación con algún tipo de patógeno.
2. Multiplicación. Esta es la fase central del proceso y por lo tanto la que implica mayores cuidados y aspectos para tener en cuenta, como lo es la formación de brotes o el tipo de respuesta que sea deseada, si se realizarán subcultivos o no, condiciones ambientales, así como el medio de cultivo y propagación adecuado.
3. Enraizamiento. Es aquí donde se decide si se desarrolla la planta completa o se obtendrán esquejes para continuar la propagación. Cualquiera que sea la decisión final deberá asegurarse que el material es de calidad y no tiene algún tipo de contaminación o patógeno que pueda desarrollar posteriormente.
4. Aclimatación para pasar a tierra o a invernadero. Es decir, dar paulatinamente las condiciones para que la planta sea totalmente autónoma.

Para que todo el desarrollo de la planta suceda es necesario la adecuada manipulación del medio de cultivo, es decir, establecer sus constituyentes orgánicos e inorgánicos, así como las

concentraciones para que el material vegetal crezca, lo cual puede incluir o no reguladores de crecimiento (Ziv, 2000).

2.2.1 Medio semisólido.

Este tipo de propagación es ampliamente usada en el cultivo de explantes de diferente origen y cuyo factor característico que la nombra es el uso de algún tipo de gelificante, el cual es el responsable de la consistencia del medio. Con respecto a lo anterior, el agar es el gelificante más ampliamente utilizado, aunque sus costos son algo elevados. En este tipo de cultivos el explante permanece estático sobre el medio de cultivo, absorbiendo los nutrientes del medio solamente el extremo que se encuentra en contacto con él (Ziv, 1995).

La propagación en general debe ser eficiente, es decir, ser rápida y con alto grado de proliferación, sin embargo, en la etapa de multiplicación se ven mermados en el medio semisólido por el alto porcentaje perdido en material contaminado (al menos 10%). La automatización es un concepto limitante pues para el medio semisólido es necesaria la intervención del humano, el cual además debe estar debidamente capacitado lo cual genera inversión y costos. Debido a lo anterior es que surge como opción el cultivar en medio líquido (Atkie-Christie, 1991; Ziv, 1991; 1995; 2000).

2.2.2 Medio líquido.

La principal característica de este tipo de medios de cultivo es la ausencia de agente gelificante, lo cual, además de darle su nombre conlleva como ventaja el aumento de la superficie de absorción de nutrientes por el explante, además de disminuir su costo por la supresión del gelificante pues suele ser el reactivo más costoso en la elaboración de un medio semisólido.

Por otro lado, tenemos la vitrificación como el enemigo a vencer, como consecuencia de estar el explante expuesto completamente al medio líquido. La vitrificación o estrés oxidativo se expresa como una marcada disminución del tamaño o poco crecimiento, apariencia vidriosa, crecimiento anormal, poca producción de clorofila, entre otras. Aunque muchas especies

presentan mayor porcentaje de propágulos pues el contacto directo facilita la toma de nutrientes (Ziv, 1991; Chen & Ziv, 2001; Rosales, 2017).

2.2.3 Sistemas de inmersión temporal en biorreactores.

En la búsqueda de disminuir o contrarrestar la problemática presentada en el medio de cultivo líquido, surge como alternativa el uso de biorreactores de inmersión periódica del tejido vegetal en el medio, permitiendo así contrarrestar el estrés oxidativo generado, además de buscar la disminución de la vitrificación y facilitando el intercambio gaseoso necesario, teniéndose así en 1981 el primer reporte de propagación en biorreactor para la multiplicación de *Begonia* (Akita & Takayama, 2005).

A partir de lo anterior, se han desarrollado innumerables modelos de biorreactores con diversas opciones y variaciones que, dependiendo de la especie y el objetivo será el óptimo para cada proceso. Los hay desechables, de vapor, tanques gemelos o los biorreactores de recipientes de vidrio con sus diversos tipos de aireación y alimentación (continuo, aireado, burbujeo, por lotes, etc), pueden ser sistemas muy complejos con softwares que programen y controlen las diversas variables implicadas en el proceso, o sistemas menos ostentosos y sencillos como lo son simples frascos de vidrio o matraces; siempre y cuando se mantengan condiciones que no comprometan el material vegetal y que, durante el procedimiento muestre crecimiento de los explantes (Ziv *et al*, 1998;).

De manera general, un biorreactor de inmersión temporal del tipo tanques gemelos está conformado por dos recipientes interconectados por tubos de silicona, en los cuales, uno está destinado para el medio de cultivo y el otro para los explantes. Debido al uso de biorreactores, será ajustable con la tecnología desarrollada el tiempo de inmersión, frecuencia, ventilación; todo lo anterior al estar conectados a un programador a válvulas solenoides, en el caso de contar con ellas, aunque pueden utilizar sistemas no tan complejos y dar muy buenos resultados. Y, aunque existen muchas variaciones en cuanto a la presentación y colocación de dichos recipientes, el principio básico consiste en hacer pasar el medio de cultivo contenido, al recipiente donde se encuentran los explantes; dejándolo ahí un tiempo determinado. Siendo este último el factor clave para el éxito del sistema, dado que de él dependerá la funcionalidad del intercambio gaseoso; el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cual estará influenciado por el volumen del recipiente, el volumen del medio y la cantidad de explantes (Takayama & Akita, 2005; Ziv, 2005; Niemenak, 2008).

Para el funcionamiento óptimo y efectivo de un sistema de inmersión temporal es necesario controlar factores ambientales como la temperatura, intensidad lumínica o periodos de luz/oscuridad, además del establecimiento de la frecuencia y el tiempo de inmersión, lo cual dependerá de cada especie con la que se trabaje. Con respecto al medio y al tejido vegetal en sí, la determinación de la densidad de cultivo y la composición, cantidad, duración y volumen del medio de cultivo resulta determinante para obtener los resultados exitosos de la producción (Walker, 1995).

Como ya se ha mencionado, la Biotecnología ofrece diferentes técnicas que permitan mejorar la eficiencia de distintos procesos de interés, en este caso la inmersión temporal en biorreactores ha permitido mejorar la propagación *in vitro* de diferentes especies; ha demostrado que, con respecto al método convencional, incrementa considerablemente la tasa de multiplicación de explantes, aumenta el porcentaje de enraizamiento, además de un incremento considerable de sobrevivencia en la aclimatación, reducción de área de trabajo así como de los costos tanto de reactivos (principalmente gelificante) y de personal necesario para el mantenimiento del proceso, repercutiendo directamente en la rentabilidad o viabilidad (Rosales, 2017).

Las ventajas que destacan del uso de sistemas de inmersión temporal son una mayor superficie de contacto del tejido vegetal con el medio, se tiene un mayor control en la composición del medio de cultivo, así como en la atmósfera al promover el intercambio gaseoso dentro del recipiente contenedor, lo cual resulta en mejoras en los niveles de multiplicación además de explantes con brotes más y mejor desarrollados (Styer, 1985; Lugo-Espinosa *et al*, 2016).

Aunque es importante señalar que las ventajas anteriormente descritas son determinadas para cada especie, variedad o propósitos de cada proyecto. Además de resaltar la importancia que marca una adecuada aclimatación pues de ella depende el éxito o fracaso del procedimiento completo; esto debido al estrés al que es sometida la plántula donde cambian sus condiciones de humedad, temperatura, aireación, luz, entre otras (Abreu, 2007; Yescas, 2016).

Rosales y colaboradores (2017) mencionan la importancia del intercambio gaseoso dentro del biorreactor, el cual estará determinado por el volumen de explantes utilizados, los nutrientes y la composición del medio de cultivo pues a partir de este último factor estará dado dicho intercambio, además de ser los responsables de la atmósfera dentro del biorreactor, pues los niveles de CO₂ y la concentración de azúcares del medio de cultivo influyen en la necesidad que presente la planta para fotosintetizar y desarrollar procesos de apertura y cierre estomático, lo cual es deseable sobre todo en etapas finales del proceso para preparar a la planta a la aclimatación y enraizamiento, además de obtener plantas más vigorosas, situación que no sucede en el caso de la propagación por el método convencional.

Es importante recalcar que la funcionalidad de esta herramienta tecnológica dependerá de la especie a trabajar e incluso, de la variedad o clon, pues las condiciones son específicas y deberán desarrollarse protocolos para determinar factores, condiciones y parámetros. Además, es una herramienta que no reemplaza la micropropagación convencional, sino que debe verse como un respaldo o como técnica complementaria a ella (Loyola-Vargas & Vázquez-Flota, 2006).

2.3 Antecedentes sobre el cultivo y *propagación in vitro* de agaves.

Como ya se ha mencionado, existen varios tipos de técnicas para la propagación vegetal; para el género *Agave* se han realizado cultivos de tejidos para especies de interés comercial (Arzate & Mejía-Franco, 2011; Reyes-Díaz *et al*, 2017) y ornamental (Rodríguez-Garay *et al*, 1996; Chávez-Ortiz *et al*, 2020).

Se tienen registros de estudios previos donde se han desarrollado exitosamente la generación *in vitro* de brotes axilares (Santacruz *et al*, 1999), enraizamiento (Enríquez del Valle, 2005) y organogénesis (Arzate & Mejía-Franco, 2011). Esto ha sido posible debido al uso de reguladores de crecimiento, en los cuales se basan los protocolos mencionados con anterioridad obteniendo resultados favorables, pues se presentó un gran porcentaje de crecimiento o enraizamiento, dependiendo el caso. Los reguladores de crecimiento son diversos, así como las concentraciones utilizadas, siendo los más comunes la 6-Bendilaminopurina (BA), cinetina (Cin), tidiazurón (TDZ) y meta-topolina (MT) (Domínguez, 2008a; Ayala-Guerrero, 2010).

Los reguladores de crecimiento, como su propio nombre lo dicen, son sustancias ya sean naturales o sintéticas que tienen efectos en el desarrollo de la planta. Existen varios tipos de ellas: auxinas, citocininas, ácido abscísico, etileno y giberelinas; siendo los más utilizados las auxinas y citocininas de forma individual o, principalmente en combinación pues dicha interacción determina la respuesta del explante. Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) como la 6-benciladenina (BA), cinetina (Cin), tidiazurón (TDZ) y metatopolina (MT) pertenecen al grupo de las citocininas, las cuales son derivadas o tiene una estructura base púrica de adenina. Su importancia radica en la promoción de división celular, pueden ser distribuidas a través de xilema o floema o ambos (Taiz & Zeiger, 2002; Pimienta *et al*, 2006; Domínguez *et al*, 2008b).

La respuesta del explante depende del explante mismo, el medio de cultivo y la interacción de éstos con la cantidad, tipo y concentración de los reguladores de crecimiento vegetal. Es bien conocido que la relación entre auxinas y citocininas desarrolla resultados muy variados, por ejemplo, una mayor concentración de citocininas genera yemas diferenciadas, mientras que la mayor cantidad de auxinas provocará rizogénesis, también se ha relacionado la senescencia con la disminución drástica de concentraciones de citocininas en el fluido xilemático, aunque el aumento de ellas genera anomalías morfológicas y de desarrollo (Jordan & Casaretto, 2006; Domínguez *et al*, 2008a; Chávez-Ortiz *et al*, 2020).

Los procedimientos de propagación mencionados hasta el momento han sido desarrollados en medio de cultivo semisólido, y aunque se han tenido resultados favorables, con el paso de los años se han tenido nuevas ideas y opciones para mejorar aún más la eficiencia de reproducción. En la alternativa de medio de cultivo líquido, se registran los usos de biorreactores de inmersión temporal, principalmente. De igual manera, el medio de cultivo puede ser enriquecido con reguladores de crecimiento de acuerdo con los resultados deseados; encontrando mayores resultados comparando con el medio semisólido considerando de igual manera la especie con la que se esté trabajando (Ziv, 1992; Niemenak, 2008; Rosales, 2017).

En el uso de biorreactores de inmersión temporal para el caso específico del género *Agave* es pobre, algunas de las especies son *A. angustifolia* (Monja-Mío *et al*, 2015), *A. tequilana* Weber (Santamaría *et al*, 1995), *A. guiengola* (Chávez-Ortiz *et al*, 2020), *A. tequilana* (Aguilar & Núñez, 2017), *A. victoriae-Reginae* (T. Moore) (Montejo & Núñez, 2016;); sin embargo, muchas otras especies no se tienen registros de haber sido propagadas aún con esta técnica.

Como mencionan Rosales y colaboradores (2017) y Chávez-Ortiz y colaboradores (2020), se pueden tener biorreactores con un sinnúmero de variables, ya sea la forma, volumen de medio, del recipiente, aireación, orientación; sin embargo, las variables importantes y que son trascendentales en estos procedimientos son el tiempo y la frecuencia de inmersión del explante en el medio de cultivo; pues de ellos no sólo dependerá la respuesta del explante mismo, sino que implica la generación de brotes, su tamaño y desarrollo morfológico, disminución de respuesta no deseada como la hiperhidratación, oxidación o necrosis.

El establecimiento de parámetros, deberá ser para cada especie y los objetivos deseados del protocolo o proyecto a desarrollar en particular, pues son varios los factores que influyen, como ya se ha mencionado, la respuesta puede ser favorable en algún aspecto pero no así en algún otro, sin embargo, el propósito implícito a buscar deberá ser la supervivencia del explante o plántula aun terminado el experimento, aunque destaca la acertada combinación de auxinas y citocininas o incluso su ausencia (Miguel-Luna *et al*, 2013; Ontiveros, 2013; Chávez-Ortiz *et al*, 2020).

3 JUSTIFICACIÓN

La importancia de los agaves en América, específicamente en México, se da desde varios ámbitos como lo es el cultural, tradicional, económico, agrícola, entre muchos otros. Debido a esto ha surgido la preocupación por desarrollar alternativas eficientes para la propagación *in vitro* de las diversas especies del género *Agave*, sobre todo considerando los largos periodos de desarrollo y niveles de reproducción reducidos reportados para la mayoría de las especies de este género. Esto aunado al grado de amenaza que enfrentan actualmente las poblaciones silvestres debido a la explotación irracional y pérdida de su hábitat. Se han empleado varias alternativas, ya sea en medio semisólido como se ha trabajado convencionalmente o el uso de nuevas opciones como la implementación de la técnica de inmersión temporal; logrando así el aumento en la producción de la especie. Es por ello por lo que se propone una alternativa con proyección a futuro próximo de ambas técnicas considerando las ventajas de cada una, y así determinar su eficiencia terminal independiente de cada método. Se desarrollará en las especies *A. parrasana*, *A. karwinskii* y *A. angustifolia*, proponiendo sistemas y protocolos de métodos de propagación mencionados.

4 HIPÓTESIS

Es posible desarrollar un sistema para la propagación *in vitro* de las especies *A. angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. parrasana* tanto en medio semisólido como en biorreactores en sistemas de inmersión temporal (BITs).

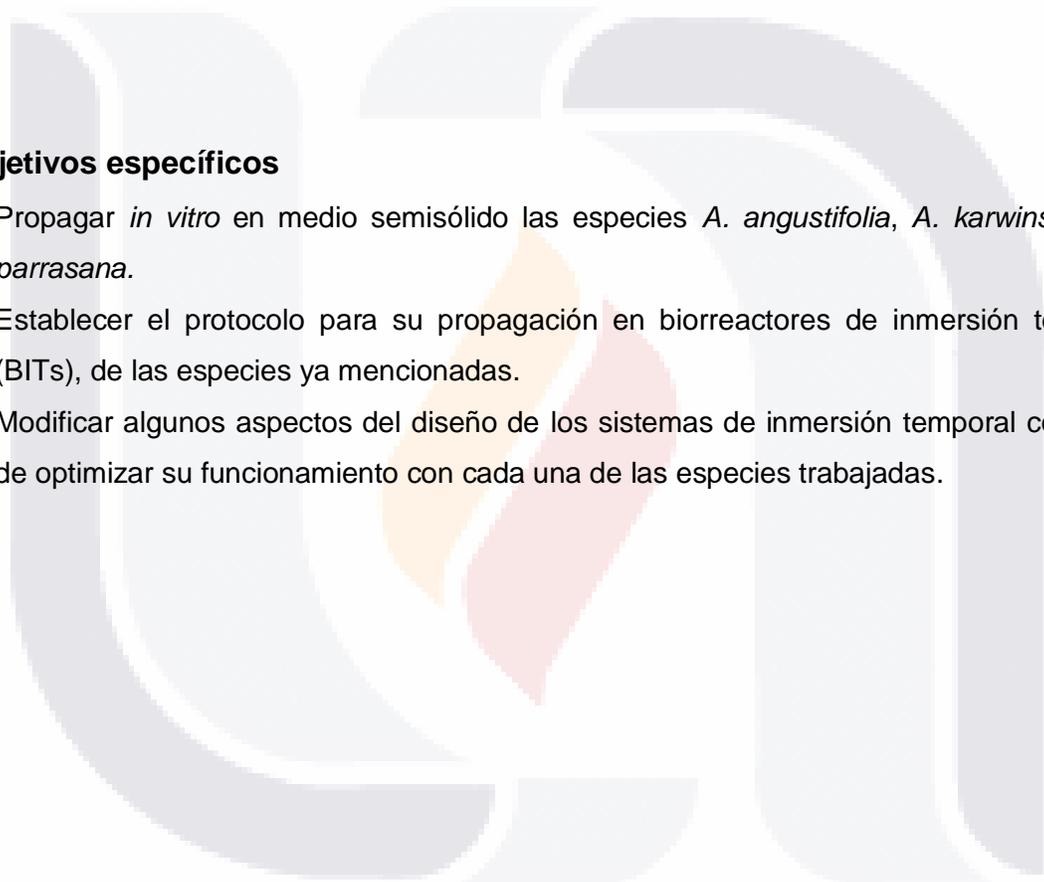
5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Desarrollar protocolos para propagar de manera *in vitro* las especies *A. angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. parrasana*, a través de medios semisólidos convencionales y con el uso medio líquido por la técnica de inmersión temporal de biorreactores.

5.2 Objetivos específicos

- Propagar *in vitro* en medio semisólido las especies *A. angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. parrasana*.
- Establecer el protocolo para su propagación en biorreactores de inmersión temporal (BITs), de las especies ya mencionadas.
- Modificar algunos aspectos del diseño de los sistemas de inmersión temporal con el fin de optimizar su funcionamiento con cada una de las especies trabajadas.



6. METODOLOGÍA

6.1 Propagar *in vitro* en medio semisólido las especies *A. angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. parrasana*.

El material vegetal utilizado de las especies *A. angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. parrasana* fueron plántulas propagadas *in vitro* que forman parte del Banco de Germoplasma de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes.

A partir de las plántulas se obtuvieron los explantes, eliminando las raíces y la parte apical de todas las hojas (Fig. 4). De cada especie de *Agave* se inocularon tres explantes por recipiente de cultivo. Se incubaron los frascos a 25°C, con periodos de luz de 16:8, hasta obtener brotes múltiples o masas de brotes poco diferenciados. Algunos de estos brotes, así como las masas de brotes poco diferenciados, se usaron como inóculo para los BITs.

6.1.2. Preparación de Medio de Cultivo MS.

El medio de cultivo usado fue el conocido como MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa y como agente gelificante se usaron 9 g L⁻¹ de agar, además, se agregaron diferentes concentraciones de BA, esto dependiendo de la especie; antes de micropropagar se esteriliza el medio de cultivo en autoclave a 120°C durante 20 minutos (Domínguez *et al*, 2008b).

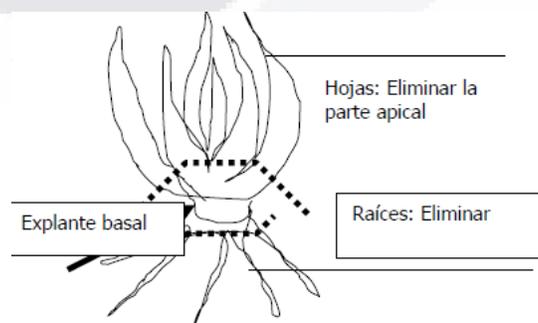


Figura 4. Muestra de los cortes necesarios para obtener explantes basales de una plántula (Ontiveros, 2013).

En esta etapa del proceso el parámetro estadístico de interés fue la media, por lo cual se obtuvieron estadísticas descriptivas de los datos obtenidos como la media y la desviación estándar, usando el programa estadístico GraphPAD PRISM 8 (Cuadro 1).

6.2 Establecer el protocolo para su propagación en medio líquido con la técnica de biorreactores de inmersión temporal (BITs), de las especies ya mencionadas.

Como sistema de propagación alternativo al medio semisólido se desarrolló un sistema de inmersión temporal por especie de agave, en el cual se usó un tiempo de inmersión de un minuto con una frecuencia de 12 horas; esto durante un periodo de 90 días. Los biorreactores utilizados fueron del tipo tanques gemelos.

6.2.1 Preparación de medio de Cultivo MS.

De la misma manera que en el método convencional, se preparó medio MS; sin embargo, ahora se suprime el uso de agar como gelificante, utilizando BA como reguladores de crecimiento vegetal, de acuerdo con la especie; para *Agave karwinskii* se utilizaron 2 mg L⁻¹ de BA en medio de cultivo líquido, mientras que, para las especies de *Agave parrasana* y *Agave angustifolia* se utilizó 1 mg L⁻¹; se usaron 5 explantes por recipiente de cultivo, dando un total de 15 explantes basales por sistema de inmersión temporal.

6.2.2 Construcción de los sistemas de biorreactores de inmersión temporal (BITs).

El sistema de biorreactores, con la técnica de tanques gemelos, está constituido por dos frascos de vidrio de 1 litro cada uno, en uno se colocaron 250 ml del medio de cultivo MS líquido con reguladores de crecimiento vegetal, y en el otro los explantes. Para el armado de los biorreactores de tanques gemelos se utilizan diversos materiales, todo debidamente esterilizado (Fig. 5); para tapar los frascos se usan tapas con dos orificios donde se colocan pasamuros, en

uno se coloca una manguera que será la unión al otro frasco, mientras que en el otro se une un filtro Midisart ® 2000 de 0.2 µm.

Como ya se mencionó, de un lado del pasamuros se instala una manguera de silicona de ¼ de pulgada, de aproximadamente 15 cm de longitud y 6 mm de diámetro, que lo une al otro biorreactor y es esta la vía por donde se transporta de un frasco a otro el medio de cultivo líquido; del otro lado del pasamuros se coloca el tubo de vidrio unidos por una manguera de silicona de ¼ de pulgada de 7.5 cm de longitud (Fig. 6).

Cada unión externa que tengan los frascos a través de los pasamuros colocados se asegura con abrazaderas de alambre para manguera, esto antes y después del filtro. La manguera de silicona (9.3-10.4 mm) que unirá al filtro con la manguera de poliuretano de la plataforma es unida a través de abrazaderas de muelle para manguera (8.9-9.3 mm) (Fig. 6).

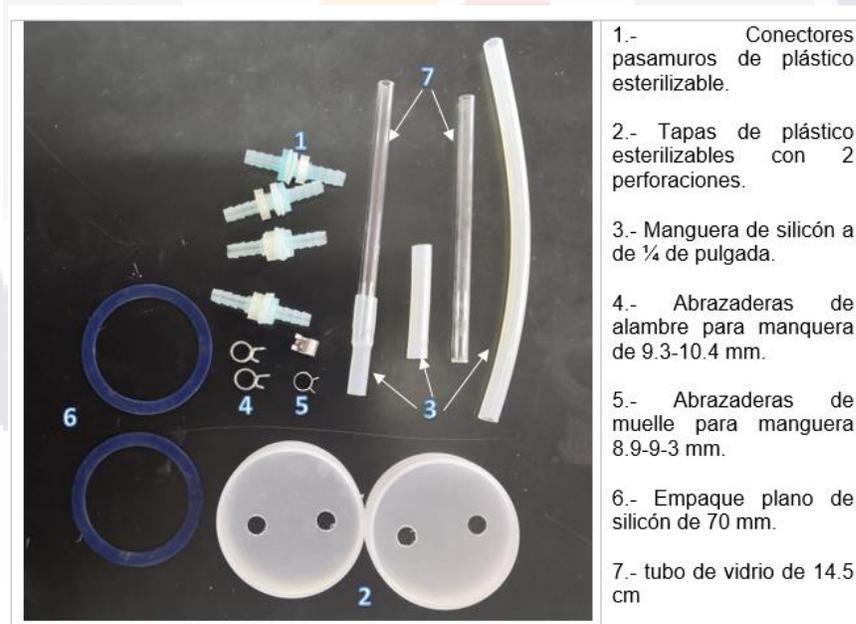


Figura 5: Biorreactor de tipo Tanques Gemelos; se observan algunos de los materiales y piezas utilizadas en el armado de los biorreactores de inmersión temporal del tipo tanques gemelos.

Todo el material es previamente esterilizado en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Mientras que los explantes se procesan dentro de campana de flujo laminar, manteniendo así las condiciones de esterilidad.



Figura 6: Biorreactores de Inmersión Temporal: Montaje completo de biorreactores de tanques gemelos, ya con filtros.

Cada sistema de biorreactores está integrado por tres pares de frascos que se colocan en plataformas, las cuales están integradas por un foco fluorescente de 120 V, cuya base está colocada en el centro. Las plataformas son producto comercial de Tecniproductos de Orizaba S.A. de C.V. las cuales tienen un panel cuya función es programar el fotoperiodo al cual será sometido el sistema, así como la frecuencia y duración de la inmersión de los explantes en el medio de cultivo. La bomba de aire se conecta a dos electroválvulas que regulan el flujo de aire, y lo dirigen a los frascos mediante mangueras de poliuretano de 0.25m que se unen a las mangueras de silicona de ¼ de pulgada que están unidas a los filtros de los biorreactores (Fig. 7).



Figura 7: Sistema de Inmersión Temporal con medio de cultivo estéril colocado en plataforma.

Al inicio del proyecto se propuso realizar cada experimento del sistema completo (15 explantes) cuatro veces por especie de agave. Considerando el parámetro determinante o principal a evaluar el número de brotes obtenidos por explante, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con una $P < 0.005$, para muestras no paramétricas, y la prueba de Dunn para comparaciones múltiples ($P < 0.005$); se usó el paquete estadístico GraphPAD PRISM versión 8.0.1.

6.2.3 Enraizamiento.

Después de los 90 días dentro de los biorreactores se sacaron los explantes, para el conteo y separación de brotes. Todo esto en condiciones estériles dentro de campana de extracción y usando material de cirugía debidamente esterilizado.

Posteriormente se colocaron durante 60 días en medio MS enriquecido con 30 g L^{-1} de sacarosa y como agente gelificante se usó agar a una concentración de 9 g L^{-1} , en esta ocasión no se agregaron reguladores de crecimiento vegetal pues se buscaba que el brote generara el crecimiento de raíces desarrollándose con los nutrientes que el medio le proveía.

6.2.4 Adaptación a condiciones *ex vitro*.

Luego de los 60 días dentro del medio semisólido para la inducción de enraizamiento se indujo a la adaptación al cambio de humedad mediante ciclos secos durante una semana, posterior a ello se sacaron las plántulas del recipiente con el medio de cultivo MS para enraizamiento. Se les retiró el remanente del medio con agua común, y se dejaron secar por un día.

Posteriormente, se colocaron en un recipiente con agua y aproximadamente 100 g del enraizador Fax Raizone Plus® durante unos minutos.

Se colocaron en bolsas negras con sustrato a una razón 2:1:1 de peat moss:tierra para maceta:vermiculita (v/v). Se colocaron dentro de bolsas transparentes de plástico cerradas en sifón, para promover la adaptación a los cambios de temperatura, humedad, agua y luz.

Se mantuvieron en invernadero dentro de las bolsas transparentes cerradas durante una semana, luego se retiraron y después de 60 días se sacaron del invernadero; durante este tiempo, permanecieron en constante monitoreo de demanda de agua.

6.3 Modificar algunos aspectos del diseño de los sistemas de inmersión temporal con el fin de optimizar su funcionamiento con cada una de las especies trabajadas.

La alternativa propuesta para este objetivo específico fue realizar cambios en los pasamuros, que son los conectores entre las mangueras del medio y el frasco con los explantes, el uso de mangueras de diferente diámetro, así como colocar una capa o base de canicas dentro del frasco donde se colocaron los explantes con el objetivo de disminuir la vitrificación presentada en los anteriores biorreactores, pues se observaba un remanente de medio líquido pequeño pero influyente dentro del sistema, pudiendo ser la causa de la hiperhidratación. Además, dejaron de colocarse en las plataformas programables.

De igual manera se propusieron tiempos de inmersión de un minuto con una frecuencia de 12 horas, durante un periodo de 90 días.

6.3.1 Preparación del medio de cultivo MS.

El medio de cultivo usado fue MS líquido, es decir se suprimió el uso de agar o cualquier otro tipo de gelificante, enriquecido con 30 g L^{-1} de sacarosa y como regulador de crecimiento se agregaron diferentes concentraciones de BA como se explica anteriormente. De igual forma se usaron 5 explantes por frasco para dicho fin, teniendo un total de 15 explantes basales por sistema de Inmersión Temporal.

6.3.2 Construcción de los sistemas de biorreactores de Inmersión Temporal modificados.

Los sistemas propuestos constaron de dos frascos de vidrio de 1L cada uno, los cuales incluían una tapa de plástico esterilizable, a las cuales se les realizaron perforaciones necesarias para colocar dos conectores tipo pasamuros neumático recto de latón con recubrimiento de níquel de 6 mm, en uno se colocó una manguera hacia adentro del frasco y en el otro la manguera de unión entre un frasco y otro para realizar el cambio de medio de cultivo (Figura 8). En todos los frascos se colocaron empaques planos de silicón de 7 mm en la tapa, antes de ser esterilizados (Figura 5). Además, después de ser esterilizados, con el material vegetal y el medio de cultivo dentro se sellaron con vitafilm (Figura 9).

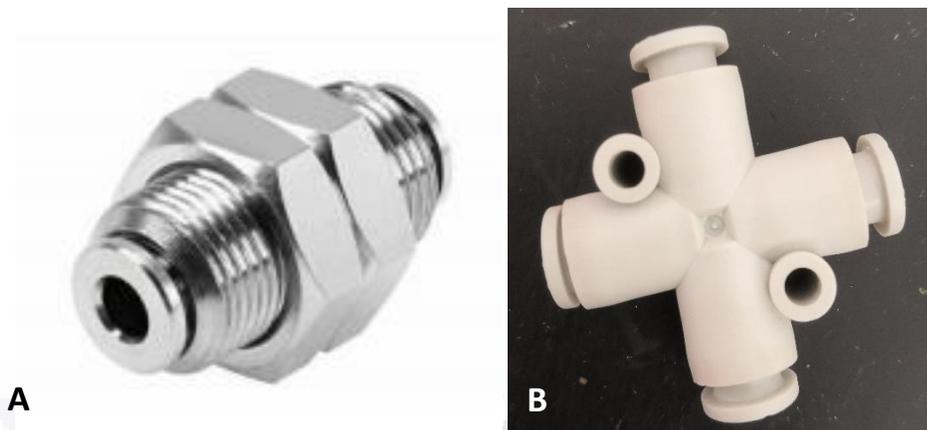


Figura 8: A) Conector tipo pasamuros neumático de latón, utilizado para los BITs modificados. B) llave de tres vías neumática.

Se usaron mangueras de poliuretano de 0.25m, debido a que el sistema neumático no permite la salida de material o de aire no fueron necesarios colocar abrazaderas después del pasamuros. Se usaron filtros Millex® asegurados a la manguera con cintillos de plástico.

Dentro del frasco destinado para colocar los explantes se pusieron 16 canicas de vidrio, cuyo objetivo principal es ser una capa entre el fondo del frasco y los explantes. Todo esto antes de ser esterilizado.

Con respecto a las bombas de aire y los temporizadores se usaron temporizadores digitales STEREN® de ocho eventos, bombas de aire OceanAqua® y ELITE 799®, además para unir las bombas a las mangueras de los tres pares de tanques gemelos se usaron dos llaves de tres vías por sistema (Figura 10).

Se utilizaron 250 ml de medio líquido MS estéril por frasco para medio, siendo un total de tres frascos para dicho fin por sistema de inmersión temporal, se colocaron 5 explantes basales por frasco teniendo la precaución de instalarlos sobre las canicas y no en medio de ellas.

Todo el material fue esterilizado en autoclave durante 20 minutos, a 120°C. Mientras que los explantes fueron tratados únicamente dentro de campana de extracción y manipulados con material de igual forma esterilizado.



Figura 9: Sistema de inmersión temporal modificado armado con explantes de la especie *A. angustifolia* y medio de cultivo estéril.



Figura 10: Ejemplares de sistemas de biorreactores de Inmersión Temporal modificado conectado completamente a las bombas y temporizadores, ya en funcionamiento.

Al inicio del proyecto se propuso realizar cada experimento del sistema completo (15 explantes) cuatro veces por especie de agave. Considerando el parámetro determinante o principal a evaluar el número de brotes obtenidos por explante, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con una $P < 0.005$, para muestras no paramétricas, y la prueba de Dunn para comparaciones múltiples ($P < 0.005$); se usó el paquete estadístico GraphPAD PRISM versión 8.0.1.



7 RESULTADOS.

7.1. Propagar *in vitro* en medio semisólido las especies *A. angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. parrasana*.

Como se mencionó en el apartado de preparación de cultivo y de explantes se utilizó medio de cultivo MS con 9 g L⁻¹ de agar, enriquecido con BA, siendo 1 mg L⁻¹ para *A. angustifolia* y *A. parrasana*, mientras que, para *Agave karwinskii* se usaron 2 mg L⁻¹.

Con respecto a los explantes, se colocaron tres por cada frasco, siguiendo la metodología también ya mencionada y condiciones asépticas.

El crecimiento de los explantes fue en un tiempo promedio de tres meses para ser utilizado en los sistemas de biorreactores de inmersión temporal. Aunque también se continuó propagando material vegetal de todas las especies, principalmente de *A. karwinskii* y *A. angustifolia*.

Al cabo de tres meses se contabilizó la respuesta que se tuvo en el medio de cultivo semisólido, considerando como resultado positivo el crecimiento del explante y el número de brotes que éste generó, mientras que, si el explante no creció o se contaminó entonces fue una respuesta negativa. En la figura 11, encontramos que las tres especies tuvieron un alto porcentaje de respuesta positiva (hubo crecimiento) de hasta un 82% para *A. karwinskii* mientras que la que tuvo menor porcentaje de éxito fue *A. parrasana* con un 73.8%.

Tipo de respuesta obtenida en medio semisólido.

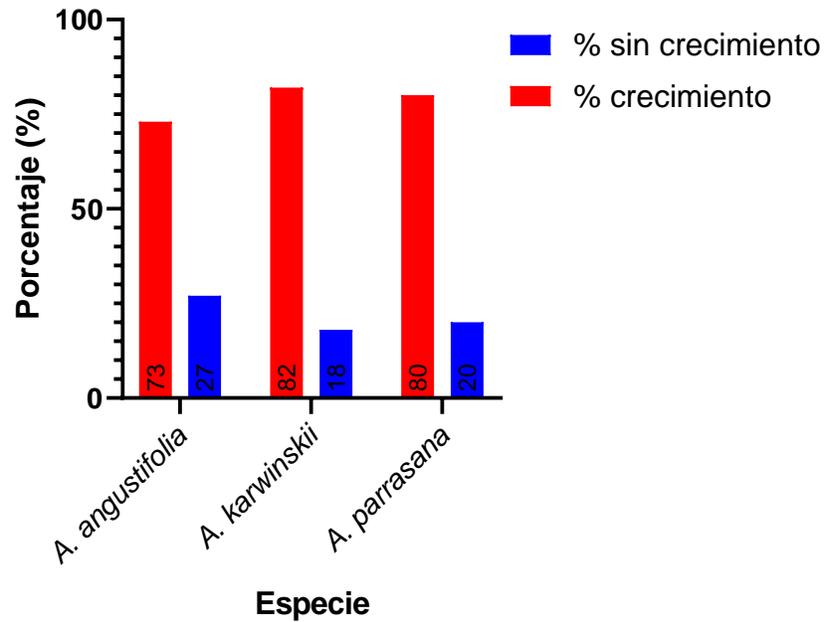


Figura 11: Porcentaje de explantos que presentaron crecimiento y presencia de brotes de las tres especies (*A. parrasana*, *A. karwinskii* y *A. angustifolia*) en medio semisólido.

	<i>A. angustifolia</i>	<i>A. karwinskii</i>	<i>A. parrasana</i>
Número de muestras	55	55	55
Mínimo	1.00	2.00	1.00
Máximo	6.00	19.0	19.0
Rango	5.00	17.0	18.0
Media	2.38	7.24	3.80
Desviación estándar	1.42	3.95	3.14
Error estándar	0.192	0.533	0.423

Cuadro 1: estadísticas descriptivas de los brotes por especie en medio semisólido.

Con respecto a los brotes obtenidos el cuadro 1 muestra las estadísticas descriptivas, la especie con mayor promedio de brotes por explante es *Agave karwinskii* con 7.24 brotes y la menor es *A. angustifolia* con solo 2.38 brotes por explante.



Figura 12: A) material vegetal de *A. angustifolia* donado por el Banco de Germoplasma. B) explantes de *A. angustifolia* después de un mes en medio para propagación.

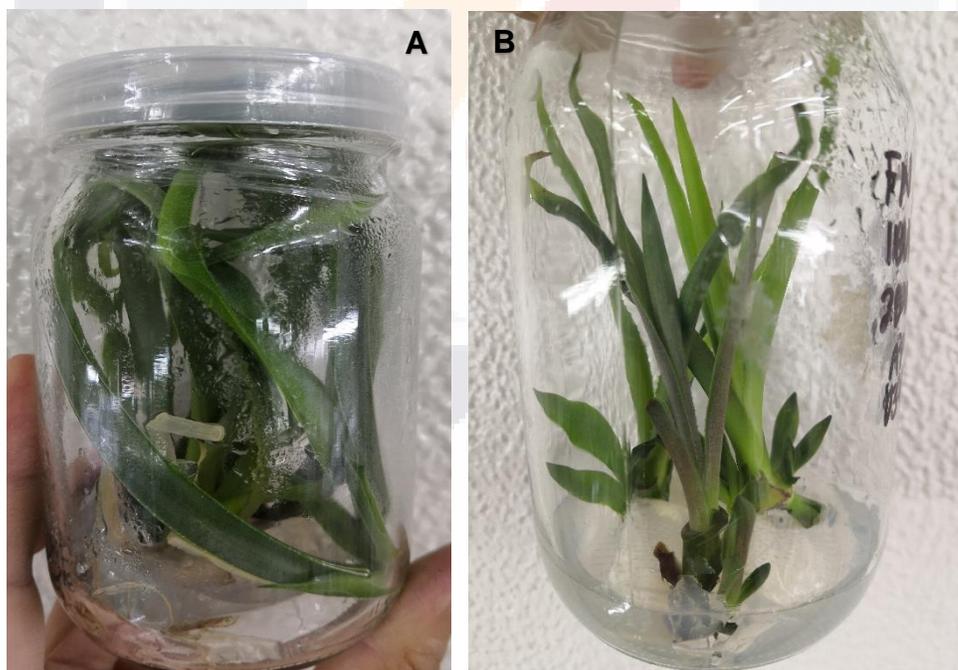


Figura 13: *A. karwinskii* en medio semisólido: A) Material vegetal donado por el Banco de Germoplasma de la Unidad de Biotecnología Vegetal. B) *A. karwinskii* después de tres meses de haber sido micropropagado.

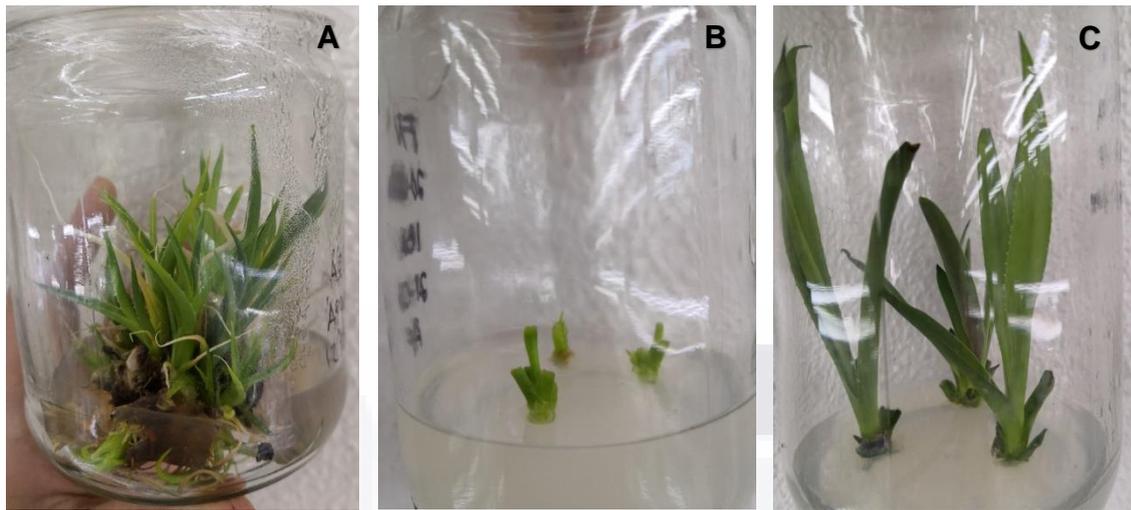


Figura 14: *A. parrasana* en medio semisólido: A) Material donado por Banco de Germoplasma. B) Explantes después de una semana en medio de propagación. C) Explantes después de tres meses en medio de propagación.

Para las tres especies se pudo notar un crecimiento a partir de la primera semana, principalmente en *A. parrasana* (Figura 14), aun así, se lograron obtener resultados óptimos de crecimiento como brotes sanos y plántulas vigorosas con espinas bien diferenciadas en las tres especies después de los tres meses como se propuso al inicio del proyecto (Figuras 12, 13 y 14).

7.2. Establecer el protocolo para su propagación en medio líquido con la técnica de biorreactores de inmersión temporal (BITs), de las especies ya mencionadas.

El medio de cultivo utilizado fue medio MS con 2 mg L⁻¹ de BA para *A. karwinskii* y 1 mg L⁻¹ para *Agave parrasana* y *Agave angustifolia*; dicho medio de cultivo se esteriliza de manera independiente y al ser armados los biorreactores dentro de las campanas de extracción se coloca el medio ya estéril dentro de los frascos, igualmente estériles.

De forma general, el procedimiento fue: armar el sistema de biorreactores (seis frascos) con el material descrito anteriormente, se cubren con aluminio los filtros para ser colocados dentro de la autoclave y ser esterilizados. Cuando estuvieron estériles los biorreactores y el medio de cultivo, se colocaron 250 ml de medio estéril en los tres frascos destinados para este fin, todo esto dentro de campana de flujo laminar.

Para los explantes: se obtuvieron explantes basales y se colocaron cinco por frasco, cada uno de ellos con 250 ml de medio de cultivo estéril, en inmersión permanente con agitación continua. Ambos, los explantes en inmersión permanente y los biorreactores con el medio de cultivo se dejaron en funcionamiento al menos 3 días, esto para detectar contaminación ya fuera del biorreactor, del medio o de los explantes. Después de este tiempo, los explantes fueron colocados dentro de los biorreactores (en el frasco que no contuviera el medio de cultivo), los fotoperiodos fueron programados en las plataformas a razón 16:8; mientras que la inmersión era de cada 12 horas durante 1 minuto. El tiempo establecido como pertinente para la toma de resultados es de tres meses. Se determinó que para cada especie se realizaran 4 réplicas y a partir de ellas determinar el promedio y valores estadísticos pertinentes para el análisis.

El promedio de brotes obtenidos arroja que, al igual que en la metodología convencional *A. karwinskii* fue la especie con mayor número comparado con las otras dos especies trabajadas con un 10.02; *A. angustifolia* duplicó su promedio (2.38 y 5.12) y en el caso de *A. parrasana* (3.80 y 7.54) no solo dobló su media, sino que también fue la única especie con presencia de raíces (Cuadro 2, Figura 16).

	<i>A. angustifolia</i>	<i>A. karwinskii</i>	<i>A. parrasana</i>
Número de datos	60	45	63
Mínimo	0.000	0.000	0.000
Máximo	42.00	29.00	40.00
Rango	42.00	29.00	40.00
Media	5.117	10.02	7.540
Desviación estándar	7.809	8.604	10.30
Error estándar	1.008	1.283	1.297

Cuadro 2: Estadísticas descriptivas del número de brotes por explante por especie en biorreactores con medio líquido.

Los tiempos propuestos para los eventos experimentales fueron de 90 días, sin embargo, por situaciones ajenas al proyecto se tuvo la necesidad de extenderse el tiempo de los explantes dentro del biorreactor. Esto tuvo efecto en el tipo de respuesta obtenido en el explante (Figura 15).

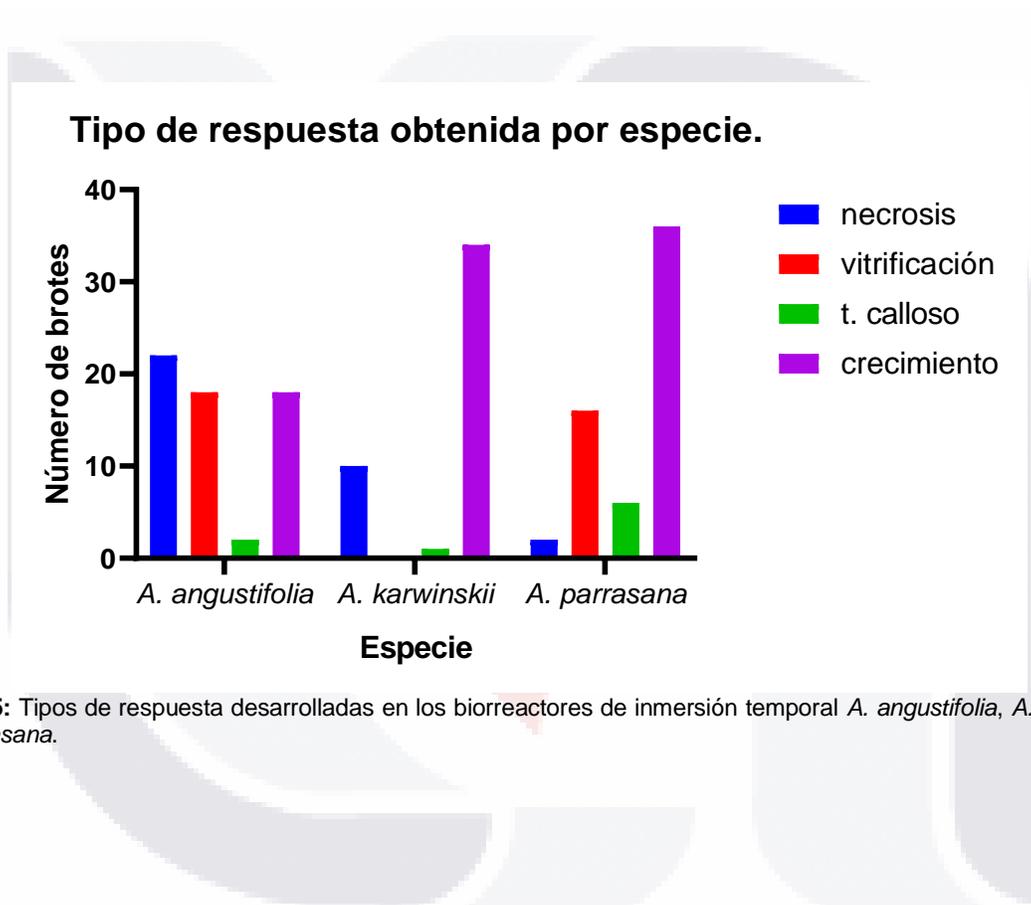


Figura 15: Tipos de respuesta desarrolladas en los biorreactores de inmersión temporal *A. angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. parrasana*.

**Número promedio de brotes por especie
(medio semisólido vs medio líquido).**

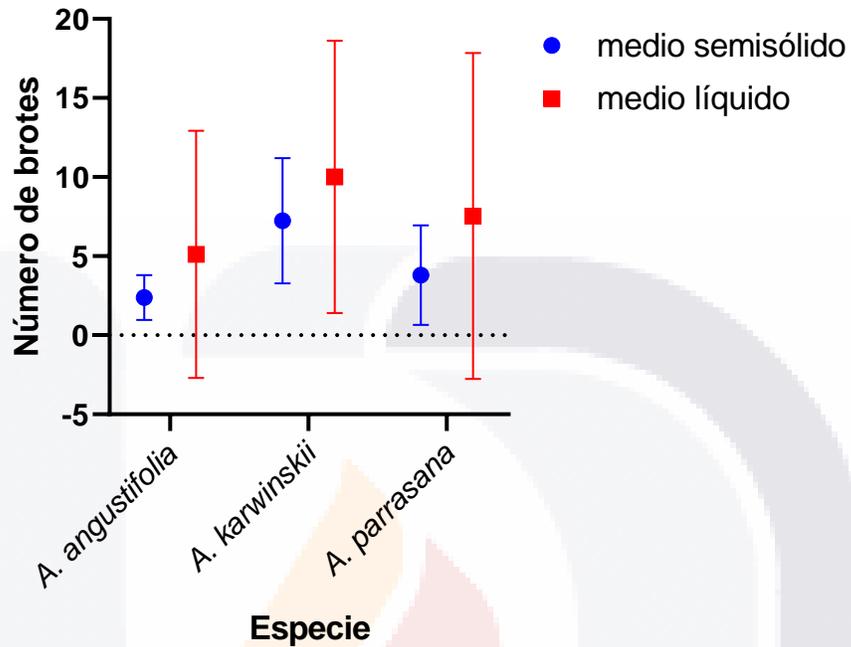


Figura 16: Comparación de número de brotes promedio obtenidos por especie en medio semisólido (rojo) y medio líquido (azul).

En la Figura 16 podemos observar un incremento en las medias de las tres especies superando a los datos obtenidos para medio semisólido, se realizaron pruebas Mann – Whitney por especie entre las dos metodologías, sin encontrar diferencias significativas. Posterior a ello se realizó una prueba Kruskal – Wallis, además de la comparación múltiple con la prueba Dunn, demostrando así diferencias significativas de una especie a otra, además de notar un aumento en la desviación estándar reflejándose en un incremento en el rango de valores donde sea posible obtener los números de brotes. Adicionalmente, como ya se mencionó, en *A. parrasana* se obtuvieron raíces dentro del biorreactor, por lo que no fue necesario pasar las plántulas a medio MS para enraizamiento y directamente se hizo la aclimatación a condiciones *ex vitro*, pues además presentaban plántulas de tamaño promedio de 7.8 ± 4.60 cm, vigorosas y con espinas bien diferenciadas (figura 23).



Figura 17: Se muestra la especie *A. angustifolia* en diferentes etapas del proceso de micropropagación en medio líquido en biorreactores; A) Explantes antes de ser colocados dentro del biorreactor. B) Explantes después de dos semanas dentro del sistema de Inmersión Temporal. C) explantes con brotes después de tres meses en el sistema de inmersión temporal. D) brotes con vitrificación. E) Sistema de Biorreactores con filtros dentro de campana de extracción para sacar explantes y realizar conteo de brotes después de 90 días en Inmersión Temporal.

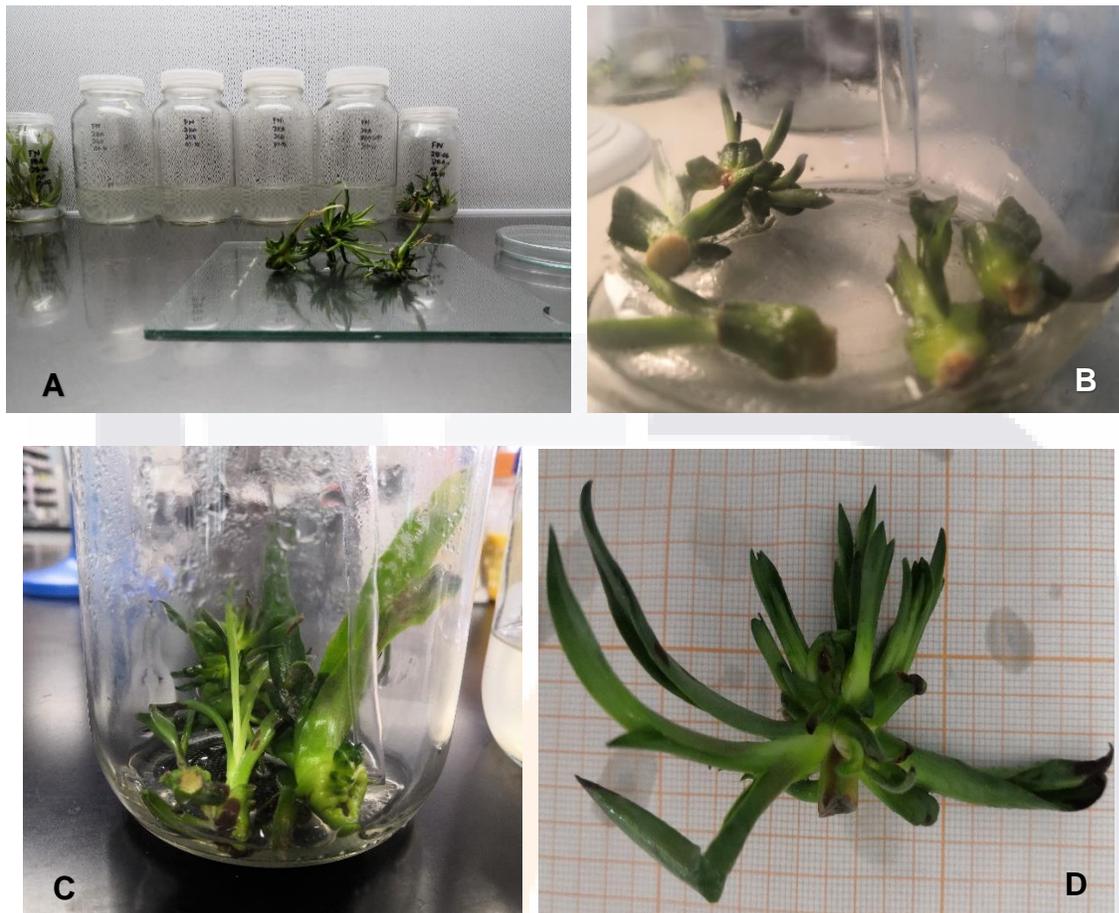


Figura 18: Se muestra a *A. karwinskii* durante diferentes etapas de la propagación *in vitro* en medio líquido por la técnica de Tanques Gemelos; A) antes de obtener los explantes basales para ser colocados en medio de cultivo para inmersión permanente (solo 3 días). B) Explantes después de 3 semanas en Inmersión temporal. C) plántulas después de tres meses dentro del biorreactor de inmersión temporal. D) explante con crecimiento múltiple de brotes.

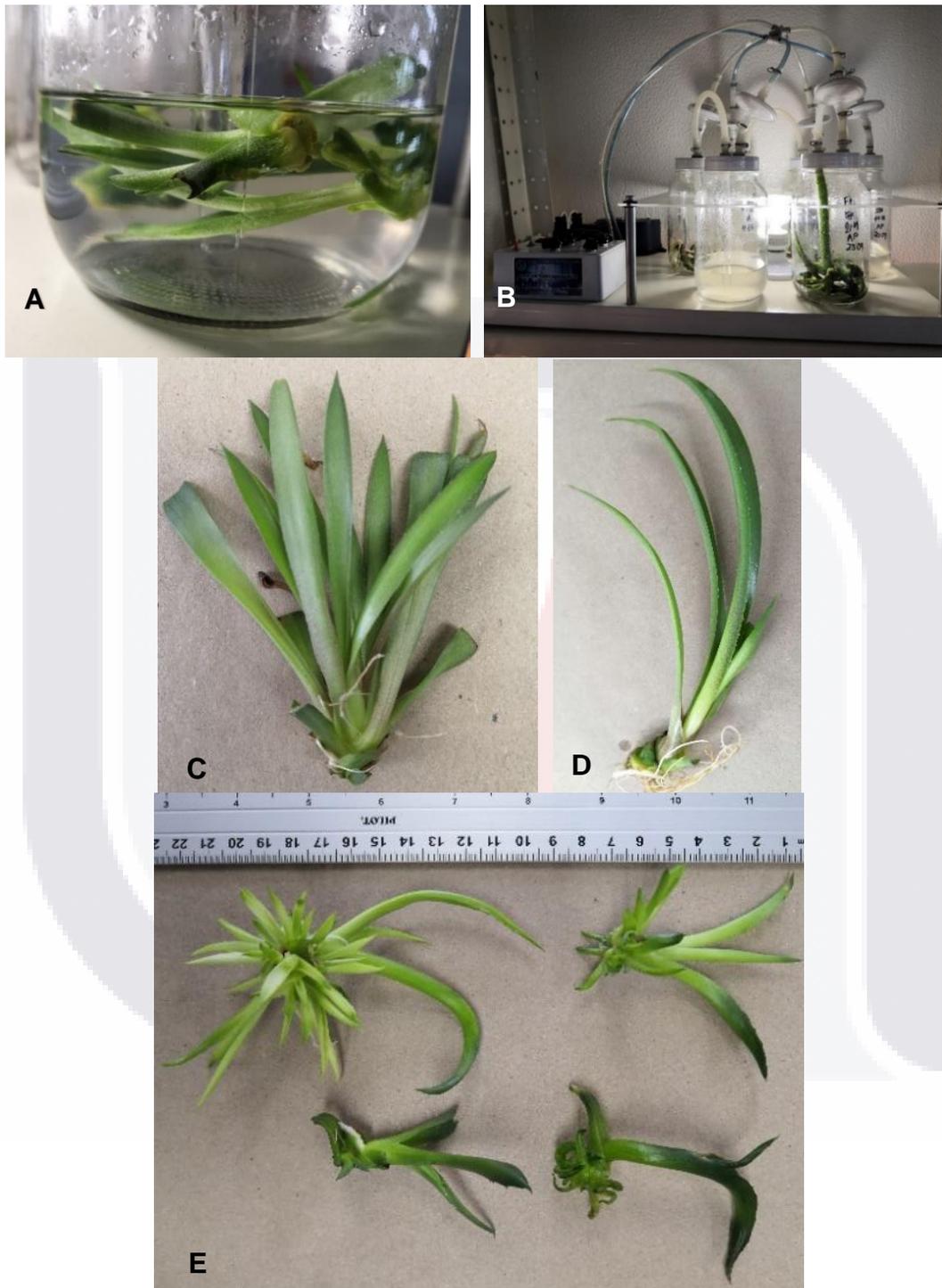


Figura 19: Se muestra a la especie *A. parrasana* durante diferentes etapas de la propagación *in vitro* en medio líquido a partir de la técnica de Tanques Gemelos; A) en sistema de inmersión temporal después de un mes. B) Sistema de Biorreactores en plataforma en uso; C) y D) plántulas después de 3 meses dentro del sistema de biorreactores, presentan diferenciación de espinas y raíces; E) brotes obtenidos en biorreactor, se muestran vitrificación, además de masa de brotes poco diferenciados.

7.2.1 Enraizamiento.

Posteriormente a los tres meses de desarrollo de los explantes, se propuso cambiar las plántulas obtenidas a medio MS, enriquecido con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 9 g L⁻¹ de agar, sin reguladores de crecimiento. Esto para que continúe con su crecimiento y desarrolle raíces (en caso de no presentarlas), y cuando éstas aparezcan cambiarlas a sustrato y en consecuencia a invernadero. Se propuso un tiempo aproximado de dos meses para el enraizamiento, luego, gradualmente realizar el cambio a *ex vitro*.

El sustrato utilizado fue a razón 2:1:1 (v/v) (peat moss: tierra para maceta: vermiculita). De igual manera, el tiempo sería dos meses para la completa adaptación de la planta a invernadero.

Es importante mencionar que todas las especies presentaron contaminación en diversas ocasiones y con diferentes fuentes ya fuera por el propio explante, el medio, el biorreactor o fugas del propio sistema.

A. karwinskii fue la única especie que no desarrolló raíces en el biorreactor, por lo cual fue necesario colocar los brotes en medio para enraizamiento, al igual que los brotes de *A. angustifolia*, siendo innecesario para *A. parrasana* (Figuras 21 y 24).

Porcentaje de raíces en brotes en Biorreactores de Inmersión Temporal (BITs) por especie (%).

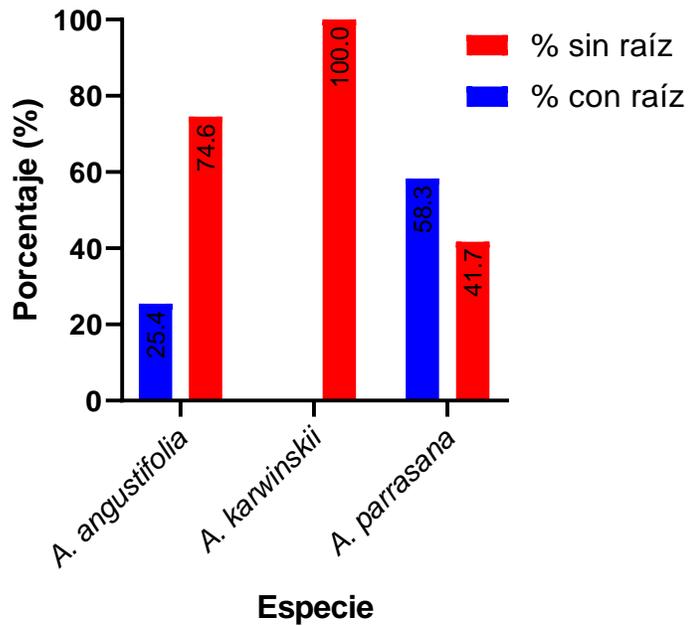


Figura 20: Porcentaje (%) de explantes que presentaron crecimiento de raíces de las tres especies (*A. parrasana*, *A. karwinskii* y *A.angustifolia*) en medio semisólido.

Debido a que, como ya se mencionó las especies *A. angustifolia* y *A. karwinskii* no presentaron raíces fueron sometidas a un método de enraizamiento en medio MS ya mencionado con anterioridad, en la etapa de enraizamiento se obtuvieron plántulas con raíz de 4.92 ± 2.42 cm para *A. karwinskii* y 6.10 ± 1.43 cm para *A. angustifolia* (Figuras 22 y 23).



Figura 21: *A. angustifolia* luego de haber estado 60 días en el medio MS para enraizamiento.

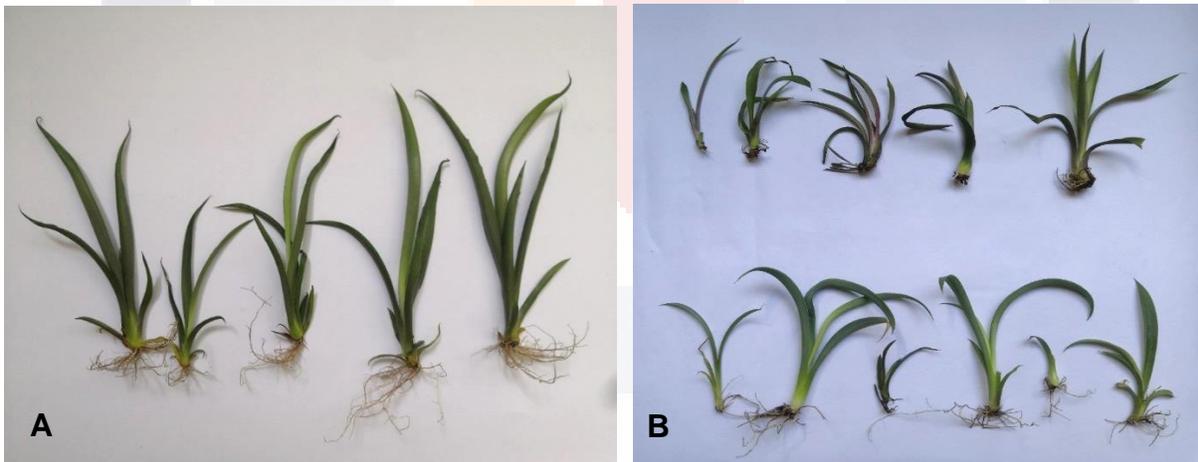


Figura 22: Se muestran ejemplares luego de permanecer en medio para enraizamiento (A), así como la comparación de explantes sin proceso de enraizamiento (arriba) y después de haber pasado 60 días en medio MS semisólido para enraizamiento (abajo) (B).

7.2.2 Adaptación a condiciones *ex vitro*.

Para el proceso de adaptación primero se colocaron las plántulas en enraizador, principalmente para la proteger a las raíces de posibles patógenos u hongos, se colocaron en bolsas con $\frac{3}{4}$ partes de sustrato (v/v) a razón 2:1:1 (peat moss:tierra para maceta: vermiculita), luego se colocaron dentro de bolsas transparentes para controlar la humedad y así propiciar la fotosíntesis y evitar la desecación de la planta. Se obtuvo así una sobrevivencia del 80% de las plántulas sometidas a este proceso, tanto de *A. karwinskii* como de *A. parrasana*.





Figura 23: Se muestran plántulas en el proceso de adaptación a condiciones *ex vitro*: A) y B) plántulas de *A. parrasana* después de ser sacadas del enraizador y siendo colocadas en la mezcla de sustratos. C) ejemplar de *A. parrasana* luego de haber sido adaptada y colocada en invernadero. D) planta de *A. karwinskii* ya adaptada y colocada dentro de invernadero sin bolsas para adaptación de humedad.

7.3 Modificar algunos aspectos del diseño de los sistemas de inmersión temporal con el fin de optimizar su funcionamiento con cada una de las especies trabajadas.

Debido a los resultados obtenidos y las observaciones durante todo el proceso de los Biorreactores de Inmersión Temporal, se tomó la decisión de tratar de contrarrestar la hiperhidratación que se presentaba al quedar remanente de medio en la base del biorreactor, por lo cual se tomó la opción de agregar canicas de vidrio en la base pues su fácil adaptación al recipiente así como su material, se ven reflejados en la manejabilidad durante el proceso, sobre todo al momento de la esterilización del material (Figura 27).

De igual forma, se usaron dos conectores tipo pasamuros neumático recto de latón con recubrimiento de níquel de 6 mm por tapa de material, cuyo material ayuda en la esterilización y en la hermeticidad del recipiente, evitando o al menos disminuyendo la probabilidad de contaminación.

En este caso, solo se probaron los BITs modificados con la especie *A. angustifolia*, se observó un aumento en la media de brotes con respecto a los obtenidos en medio semisólido,

aunque muy parecido al anterior empleando biorreactores, se tuvo además un incremento en la desviación estándar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con una $P < 0.005$, para muestras no paramétricas, y la prueba de Dunn para comparaciones múltiples ($P < 0.005$); se usó el paquete estadístico GraphPAD PRISM versión 8.0.1 (Figura 25).

Aunado a los incrementos en la media, la variación en el tipo de respuesta obtenida fue mayor que en los otros dos sistemas utilizados, debido al prolongado tiempo de los explantes dentro del recipiente y en contacto con el medio, presentando así desde brotes sanos y vigorosos hasta tejido calloso, necrosis e hiperhidricidad (Figura 26).

Comparación de los tres sistemas para *A. angustifolia*.

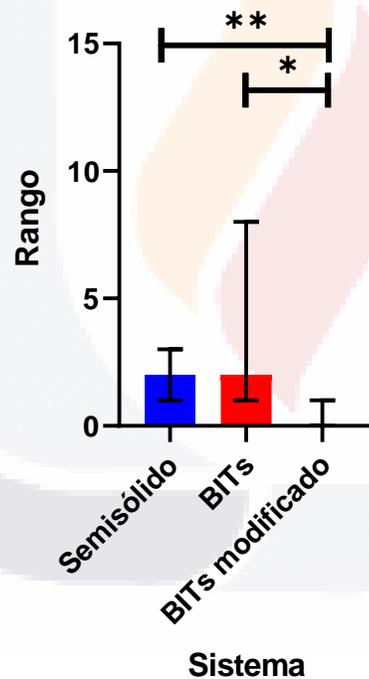
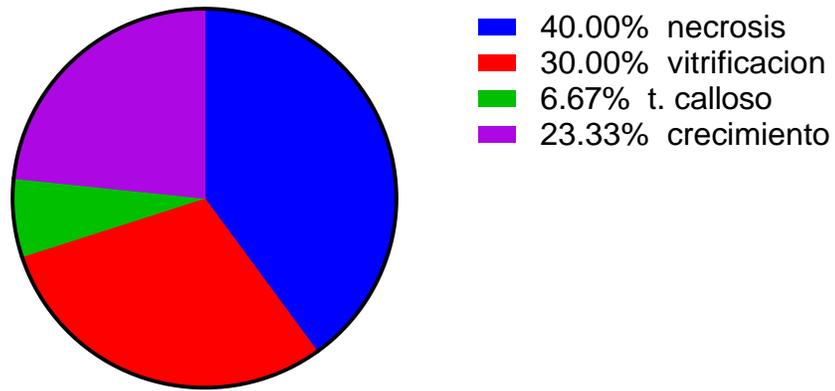


Figura 24: Resultados de los tres sistemas para la especie *A. angustifolia*. Las líneas de error muestran el rango intercuartil, las barras son las medianas (ANOVA no paramétrica) y las líneas muestran diferencias significativas de acuerdo con la prueba Dunn ($P < 0.005$); existen diferencias significativas entre el medio MS semisólido y el sistema BIT modificado, así como entre BITs y BITs modificado.

La prueba ANOVA no paramétrica muestra que existen diferencias significativas entre el sistema de Biorreactores modificados con el medio semisólido y entre los dos tipos de BITs (modificados y no modificados).

Respuesta obtenida en *A. angustifolia* en Inmersión Temporal modificado.



Total=30

Figura 25: Se muestra los tipos y frecuencia de respuesta obtenidas en biorreactores de Inmersión Temporal modificados para *A. angustifolia*.

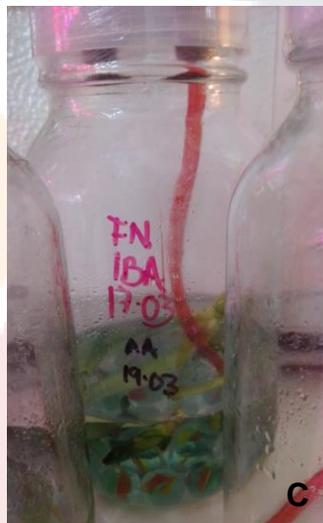
Como ya se mencionó una de las ventajas del uso de canicas de vidrio es que el material inerte, además de su adaptabilidad al recipiente debido a su tamaño, facilitando también su esterilización; sin embargo, al ser objetos pequeños, pero de peso considerable en comparación con los explantes y brotes, se presenta diferentes respuestas no deseables debido a cizallamiento (Figura 27).



A



B



C



D

Figura 26: Se presenta Biorreactores de Inmersión Temporal modificado armado completamente y en funcionamiento, con explantes y medio de cultivo. B) y C) ejemplos de biorreactores con canica en la base del recipiente, así como explantes dentro, además de observarse los conectores tipo pasamuros neumático recto de latón con recubrimiento de níquel de 6 mm. D) frascos con canicas y explantes al final del proceso de Inmersión Temporal, a punto de ser sacados para conteo de brotes.



Figura 27: Se muestran plántulas de *A. angustifolia* después del proceso de micropropagación en medio líquido, así como algunos tipos de respuesta; A) Comparación de los diferentes tipos de respuestas presentadas en este tipo de sistemas de Inmersión Temporal modificado. B) Ejemplares con resultados positivos, es decir, múltiples brotes, presencia de raíces, hojas sanas y vigorosas y espigas diferenciadas. C) Ejemplares donde se tiene la base y algunas de las hojas con hiperhidratación. D) ejemplar donde observa la presencia de raíces. E) ejemplar con brotes, después del periodo de Inmersión Temporal, donde puede observarse el daño en una de las hojas, muy posiblemente debido a cizallamiento.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

- **Propagar *in vitro* en medio semisólido las especies *A. angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. parrasana*.**

La principal variable que se analizó en este trabajo fue la media del número de brotes obtenidos por explante. Este valor es el más importante en un esquema de micropropagación ya que determina la tasa de multiplicación y, por tanto, el potencial productivo del método desarrollado. En el caso del medio semisólido encontramos que, la especie con mayor número de brotes fue *A. karwinskii* (7.24) comparado con *A. angustifolia* y *A. parrasana*. Siendo un promedio mayor al obtenido por Ríos-Ramírez (2017) quien obtuvo 6.1 brotes en promedio con la misma concentración de BA que la usada en este proyecto, e incluso un 6.6 obtenido por Domínguez y colaboradores (2008), también bajo la misma concentración de BA. En el caso de *A. parrasana* su promedio fue de 3.8 brotes por explante marcando una diferencia considerable con los 22 brotes promedio de Santacruz- Ruvalcaba (1999), sin embargo, en este caso a pesar de que también obtuvieron algunas raíces se agregó al medio 2,4-D (2,4- ácido diclorofenoxiacético).

Por otro lado *A. angustifolia* generó 2.38 brotes por explante en promedio, se corrobora así el uso de BA como regulador de crecimiento, con el cuál, a pesar de ser especies diferentes y poder responder de maneras muy distintas, es con este RCV con el que varias especies de agaves generaron brotes y no otro tipo de respuestas (Domínguez *et al*, 2008; Ríos-Ramírez, 2017).

Es importante mencionar que, a pesar de que en las tres especies se tuvo presencia de raíz, no contaba con el tamaño necesario para ser llevadas directamente a sustrato o someterse a ciclos secos para su consecuente adaptación, en el caso de micropropagación en medio semisólido sería necesaria una etapa adicional de enraizamiento, ya sea con medio cuya concentración de sales inorgánicas sea al 100% en MS o reducido dicho porcentaje, además de que, como varios autores ya lo han reportado en diversas especies de agaves, el uso de auxinas acelerará favorablemente el crecimiento y desarrollo de raíces (Domínguez- Rosales, 2008; Enríquez del Valle *et al*, 2005, 2013; Pérez *et al*, 2012; Miguel-Luna *et al*, 2014).

Independientemente de la especie, se encontraron respuestas negativas o poco favorables como la contaminación del medio, principalmente por hongos. Las tres especies presentaron contaminación en algún porcentaje (Figura 11), pues se reúnen todas las condiciones favorables para el crecimiento de bacterias u hongos, como los nutrientes, luz y humedad que puede marcar el punto de partida para que, si algún agente contaminante se encuentra en el medio o en el mismo explante, prolifere.

- **Establecer el protocolo para su propagación en biorreactores de inmersión temporal (BITS), de las especies ya mencionadas.**

Al igual que en el sistema anterior, el principal parámetro fue la media de brotes por explantes obtenidos por especie; como se muestra en el cuadro 2 se tuvo un incremento en la media de las tres especies, incluso en dos de ellas se duplicó, mientras que *A. karwinskii* permaneció como la especie con mayor número de brotes (10.02). Ríos-Ramírez (2017) reporta un promedio de 10.5 brotes por explantes al emplear 1.5 mg L^{-1} de BA para esta misma especie. La inmersión temporal cada vez se usa más y ha tomado más importancia en otras especies, obteniendo resultados favorables en piña (Escalona *et al*, 1999), caña de azúcar (Lorenzo *et al*, 1998), moringa (Matos *et al*, 2016), papa (Montoya *et al*, 2008), plátano (Roels *et al*, 2005; Aragón *et al*, 2006), papaya (Posada *et al*, 2003), por mencionar algunos. Aunque en el caso de Agaves son pocas las especies en las que se han propagado de esta forma, se reportan promedio de 7 brotes para *A. victoriae-reginae* (Durán & Núñez, 2015), 4 brotes para *A. tequilana* Weber (Aguilar & Núñez, 2017), 2.67 brotes para *A. durangensis* (Godoy & Núñez; 2015) y 47 brotes para *A. guiengola* (Chávez-Ortiz *et al*, 2020).

De forma general, al comparar el número promedio de brotes para ambos objetivos, podemos notar que *A. karwinskii*, permanece como la especie con mayor valor en dicho parámetro, mientras que las otras dos especies incluso duplican los promedios obtenidos en la metodología tradicional (Figura 16). Varios autores mencionan que por el hecho de que en medio líquido el explante tiene mayor contacto con el medio, se facilita la absorción de nutrientes y RCV, y en consecuencia la generación de brotes nuevos.

En la especie *A. parrasana* se obtuvo un incremento notable en la generación de brotes con respecto al medio semisólido (3.80 en medio semisólido y 7.54 en medio líquido). Además de ser la única especie en desarrollar raíces ideales para adaptación *ex vitro* dentro del biorreactor, por lo cual se realizó directamente el cambio a sustrato, sin tener que pasar por una etapa extra de enraizamiento (Figura 23). En promedio, la longitud de las plántulas obtenidas de los biorreactores para esta especie fue de 9.8 cm, y para el caso de las raíces fue de 6.1 cm en promedio; representando así una ventaja de la Inmersión Temporal sobre la metodología tradicional pues se presenta mejor desarrollo tanto de la raíz como de la plántula. Además, como menciona Ríos-Ramírez (2017) pueden obtenerse raíces en medio MS pero deberán utilizarse otro tipo de reguladores de crecimiento vegetal o una combinación de ellos.

El promedio de brotes obtenidos en *A. angustifolia* es de 5.12, siendo la segunda especie con mejor respuesta. Además, fue una de las especies con resultados más variados, hubo plántulas muy vigorosas cuyas hojas contaban con espinas desarrolladas, aunque también hubo presencia de explantes y brotes vitrificados (Figura 17).

En el caso de *A. karwinskii*, a pesar de que fue la especie con mayor problemática de contaminación dentro del biorreactor, fue la especie con menor porcentaje de vitrificación (Fig.16), además de que presentó el mayor número promedio de brotes por explantes, tanto en medio semisólido como en medio líquido (Fig. 18), aunque también fue la que presentó mayor valor de desviación estándar, es decir, se tiene un rango mayor en el número de brotes por explante.

Con respecto a la alta incidencia de contaminación, Pospisilova, *et al* (1999) y Grob *et al* (1993) mencionan que, para medio líquido la concentración de azúcares como sacarosa afecta la fijación de CO₂ en la planta, además de las cantidades mayores de agua comparado con el medio semisólido podrían tener como consecuencia la presencia de contaminación fúngica o bacteriana, recomendando utilizar medios con fuentes de carbono en menores concentraciones.

Después de los tres meses establecidos para el desarrollo del explante se observó un crecimiento notable de las hojas, sin embargo, muy pocos brotes tenían raíz, principalmente para *A. angustifolia* y *A. karwinskii*, y los que pudieron desarrollarla era muy pequeña para ser colocada directamente en sustrato, por lo cual se decidió colocarlas en medio MS semisólido sin RCV, para que continuara desarrollándose (Figura 20 y 21).

Aunque se puede notar un incremento en los brotes con respecto a los reportados anteriormente, es importante mencionar como uno de los inconvenientes con los que nos enfrentamos fue, la hiperhidratación o vitrificación, pues como menciona Ziv (1991) las altas concentraciones de humedad dentro del biorreactor pueden generar múltiples cambios en las hojas principalmente, así como anomalías fisiológicas y morfológicas, así como posible generación de tejido calloso (Figura 18). La vitrificación es una respuesta del explante no deseada pues, a pesar de que no es la única problemática que se enfrenta al usar medio líquido, hasta el 90% de las pérdidas de tejidos o explantes son debidas o derivadas a vitrificación (Grout, 1988; Ivanova, 2009).

Aun así, el porcentaje de explantes con crecimiento normal (sin vitrificación) es mayor al de los explantes vitrificados. Además, se trata de una de las especies con mayor adaptación registrada (Barrientos-Rivera *et al*, 2019), por lo que se espera una supervivencia de una alta proporción de los brotes normales.

Aunque algunas de las anomalías fisiológicas pueden ser corregidas con un tratamiento antes de ser transferidos a tierra (Pospisilova *et al*, 1999), no puede asegurarse lo mismo para el tejido calloso y tejido vitrificado; pues la probabilidad de que sobrevivan es mínima. Sería necesario un tratamiento alternativo o someterlas a medios de cultivo semisólido con reguladores de crecimiento para lograr que el tejido calloso genere explantes, sin embargo, se compromete a la especie pues el tejido calloso favorece la aparición de cambios genéticos y epigenéticos en el material, provocados por aberraciones cromosómicas y/o mutaciones.

La mayoría de los explantes, después de los tres meses de incubación presentaban múltiples brotes (Figura 19) cuyo conteo era difícil hasta el momento de separarlos en campana. A pesar de que la alta humedad del mismo ambiente dentro del biorreactor puede generar cambios sobre todo en la estructura de las hojas por el tamaño del recipiente, principalmente por oxidación o daño mecánico al no tener espacio suficiente dentro del recipiente contenedor; *A. karwinskii* fue la especie con menores problemas de hojas rotas o dañadas (Figura 28).

Además de brotes sanos, que era la respuesta deseada y esperada, como ya se mencionó, se tuvo una gama de respuestas como la vitrificación, tejido calloso e incluso necrosis,

se intensificó su aparición por la prolongada permanencia de los explantes dentro del medio, siendo desde 36 hasta, en algunos casos, 89 días más a los propuestos.

Aunque la Inmersión Temporal ha tomado gran relevancia y desarrollo en diferentes especies, aun no se tiene datos reportados para muchas especies de agaves, sin embargo, Monja-Mío y colaboradores (2020), reportaron un promedio de 3.89 raíces por explante para *A. tequiliana*, con una longitud promedio de 7.91 cm, utilizando BioMINT Bioreactors, con los mismos parámetros usados en este proyecto pero en este caso para enraizamiento, demostrando así otra ventaja y uso de biorreactores o de la Inmersión Temporal, desarrollando raíces, utilizando los RCV necesarios para ello (2,4-D en este caso).

Directamente se hizo el cambio a *ex vitro* en la combinación de sustrato mencionada en la Metodología, sometiéndola previamente a ciclos secos, en los cuales se comenzó a abrir el biorreactor, pues como mencionan Pospisilova, *et al* (1999) y Van Huylbroeck *et al* (1996 y 1998), establecer un tratamiento previo a la exposición *ex vitro* ayuda a la planta a adaptarse al cambio de los múltiples factores a los cuales estuvieron expuestos dentro del biorreactor, entre ellas la alta humedad, concentraciones de gases como CO₂, temperatura e intensidad y tipo de luz. Una adecuada adaptación al medio externo trae como consecuencia un engrosamiento de las hojas, lo cual en este caso es muy necesario pues son especies que esta es su principal característica, cambio de la forma y tamaño de las estomas, facilitando la fotosíntesis y la transpiración, así como la estabilización de concentraciones de agua.

Durante la aclimatación puede esperarse pérdida de hojas, pues pueden generarse nuevas, aunque durante las primeras tres semanas el crecimiento es lento, dado que los parámetros fotosintéticos se están acoplando a nuevas cantidades de luz, agua y humedad tal como lo menciona Van Huylbroeck (1998), es por ello por lo que la adaptación deberá ser lenta. En este proyecto, se tuvo un 80% de plántulas adaptadas completamente a sustrato, ya sin bolsas para control de humedad y temperatura.

- **Modificar algunos aspectos del diseño de los sistemas de inmersión temporal con el fin de optimizar su funcionamiento con cada una de las especies trabajadas.**

La especie de *A. angustifolia* fue la única que se sometió a los tres métodos de propagación propuestos para este trabajo de tesis, se presentaron inconvenientes principalmente con los tiempos dentro del Sistema de Inmersión Temporal, teniendo como consecuencia variaciones marcadas en el tipo de respuesta obtenida, principalmente respuestas negativas (Figura 26). De acuerdo con Ziv (1991 y 1992), al someter los explantes a tiempos prolongados al medio de cultivo cuya composición puede comprometer su respuesta, sobre todo en el caso de las especies trabajadas donde, a partir de la vitrificación se tiene el adelgazamiento de las paredes celulares, siendo esto indeseable pues los agaves se caracterizan por exactamente lo contrario y lograr así su adaptación a diferentes climas (Robert *et al*, s.f.; Monja-Mío, 2015; Barrientos-Rivas *et al*, 2019).

Uno de los objetivos es demostrar que, la inmersión temporal es más eficiente que el método tradicional de micropropagación, y en ese aspecto podemos considerar que se cumplió el objetivo, pues, no solo se aumentó el promedio de brotes, también, se obtuvieron plántulas mucho más grandes y en una especie se lograron desarrollar raíces lo suficientemente grandes, lo que permitió omitir el paso de enraizamiento *in vitro*.

Pudo notarse el incremento de hojas oscuras o en tonalidades cafés en la parte correspondiente al ápice, siendo esto posible al reducido tamaño del recipiente contenedor o a posible daño mecánico como el cizallamiento provocado por las mismas canicas usadas en los Biorreactores de Inmersión Temporal modificados (Figura 27).

A pesar de que, se tuvieron respuestas mucho más variadas comparados con los otros dos métodos de propagación *in vitro*, se obtuvo una media parecida a la de biorreactores sin modificaciones (Figura 25). Las primeras semanas dentro del biorreactor son las esenciales para la generación de brotes, y las posteriores para su desarrollo, generando así las plántulas vigorosas, con espinas bien diferenciadas e incluso con raíces en algunos casos (Robert *et al*, s.f.;), el tiempo que permanecieron dentro del biorreactor afectó directamente la respuesta e incluso los brotes mismos, pues algunos no pudieron contabilizarse; se tuvo un incremento de 39 y 46 días posteriores a la fecha propuesta para continuar el proceso de enraizamiento.

Entre el medio semisólido y los primeros biorreactores no se tienen diferencias significativas, la diferencia aparece al momento de comparar las tres metodologías, debido al número de muestras disponibles del tercer método (Figura 24).

Este proyecto tiene oportunidades de crecimiento y mejora, pudiendo, por mencionar algunas: el desarrollo o establecimiento del periodo de días adecuado para cada especie, recordemos que las primeras semanas son primordiales para la generación de brotes y el tiempo restante para desarrollo de la planta, sin embargo, los tiempos prolongados dentro de los biorreactores nos demuestran el deterioro del explante y de sus brotes. De igual manera se podría considerar la opción de realizar la etapa de enraizamiento utilizando la técnica de Inmersión Temporal, pues hay evidencia que respalda el uso de los biorreactores para este fin en específico, obteniendo resultados aceptables y gran porcentaje de supervivencia a condiciones *ex vitro*. Aunado a ello, podrían proponerse el uso de RCV en el medio de cultivo para acelerar el proceso de enraizamiento, acelerando así el tiempo dentro del biorreactor y el desarrollo de las raíces.

9. CONCLUSIONES

Se lograron propagar en medio semisólido y por método *in vitro* convencional las especies *Agave angustifolia*, *A. karwinskii* y *A. parrasana*, siendo el principal parámetro para considerar el promedio de brotes por explante (2.38, 7.24 y 3.80 respectivamente).

Las mismas especies se propagaron de forma *in vitro* en medio líquido en un Sistema de Inmersión Temporal a partir de la técnica de tanques gemelos. Siendo la inmersión cada doce horas con una duración de un minuto, obteniendo promedios de brotes mayores a los obtenidos en medio convencional en *A. angustifolia* (5.12), *A. karwinskii* (10.02), y en *A. parrasana* (7.54) demostrando así la eficiencia del método de inmersión temporal y el uso de medio líquido, pues no sólo en la mayoría de las especies el número de brotes fue mayor, sino que, además en la especie *A. parrasana* se desarrolló raíz, siendo posible así realizar la transferencia a suelo directamente del biorreactor al sustrato, en invernadero.

La especie *A. angustifolia* pudo propagarse en sistemas de Inmersión Temporal modificados, con un promedio de brotes por explante mayor al del sistema de propagación tradicional, demostrando ventaja de la propagación en medio líquido sobre el medio semisólido.

Las respuestas obtenidas en los tanques gemelos modificados fueron variadas, teniendo desde brotes sanos y viables hasta explantes con vitrificación o necrosados, esto debido al prolongado tiempo que permanecieron dentro del biorreactor, de hasta 89 días posteriores a los 90 días propuestos inicialmente para el caso de biorreactores sin modificaciones.

A pesar de que, en este caso los resultados fueron favorables y se demostró la eficiencia mayor de los Sistemas de Inmersión Temporal sobre la propagación en medio semisólido convencional, hace falta trabajo experimental para corroborar dicha información sobre las especies faltantes en los biorreactores modificados, así como mejorar las modificaciones en sí para optimizar la respuesta de los explantes.

Se tiene evidencia bibliográfica donde se usa la inmersión temporal para agaves, siendo otras especies, otros tipos de recipientes o técnicas, principalmente BioMINT y RITAs, utilizando diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal o combinaciones de ellos,

cuyos objetivos han sido la generación de raíces o brotes. Sin embargo, de las especies trabajadas en este proyecto solo se ha aplicado para *A. angustifolia*, en condiciones diferentes a las propuestas. Siendo entonces este uno de los proyectos donde se trabaje, para propósitos de multiplicación de brotes, con las tres especies.



10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, E. R. & Núñez, H. G. (2017) Establecimiento de *Agave tequilana* Weber variedad azul en un sistema de inmersión temporal (SIT). Verano de Investigación Científica. Jóvenes en la ciencia. 3 (2).
- Akita, M. & Takayama, S. (1994). Induction and development of potato tubers in a jar fermentor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36. Pp: 177-182.
- An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV (2016). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 188. Pp: 1- 20.
- Arzate-Fernández A. & Mejía-Franco R. (2011). Embryogenic capacity of induced calli on zygotic embryonic axis of *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotécnica Mexicana*. 34 (2). Pp: 101-106.
- Ayala-Guerrero, L. (2010). *Inducción de embriogénesis somática en cultivo in vitro de Agave atrovirens karw. Ex salmdyck* [tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada].
- Barrientos-Rivera, G., Esparza-Ibarra, E. L., Segura-Pacheco, H. R., Talavera-Mendoza, O., Sampedro-Rosas, M. L. & Hernández-Castro, E. (2019). Caracterización morfológica de *Agave angustifolia* y su conservación en Guerrero, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 10 (3).
- Chávez-Ortiz, L. I., Morales-Domínguez, J. F., Rodríguez-Sahagún, A & Pérez-Molphe-Balch, E. (2020). *In vitro* propagation of *Agave guiengola* Gentry using semisolid medium and temporary immersion bioreactors. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*. Tech Science Press. DOI: 10.32604/phyton.2020.012862
- Chen, J & Ziv, M. (2001). The effect of ancymidol on hyperhydricity, regeneration, starch and antioxidant enzymatic activities in liquid-cultured *Narcissus*. Cell biology and morphogenesis. *Plant cell reports*. 20: 22-27.
- Colunga-García, P. & May-Pat, F. (1997). Morphological variation of henequén (*Agave fourcroydes*, *Agavaceae*) germplasm and its wild ancestor (*A. angustifolia*) under uniform growth conditions: diversity and domestication. *American Journal of Botany*. 84 (11). Pp: 1449-1465.
- Colunga-García, P., Estrada-Loera, E. & May-Pat, F. (1996). Patterns of morphological variation diversity, and domestication of wild and cultivated populations of *Agave* in Yucatan, México. *American Journal of Botany*. 83 (8). Pp: 1069-1082.

- Colunga-García, P., Larqué, A., Eguiarte, L. E. & Zizumbo-Villarreal. (2007). *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. Sistema de centros Públicos de Investigación del CONACYT, Centro de investigación científica de Yucatán, Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO), Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología.
- Debergh, P. C. & Zimmerman, R. H. (1991). *Micropropagation: technology and application*. Kluwer academic publishers.
- Domínguez, M., Alpuche, Á., Vasco, N. & Pérez, E. (2008) (a). Efecto de citocininas en la propagación *in vitro* de Agaves mexicanos. *Revista Fitotécnica Mexicana*. Vol. 31 (4). Pp: 317-322. ISSN 0187-7380.
- Domínguez, M., González, M., Rosales, C., Quiñones, C. Delgadillo, S., Mireles, S. & Pérez, E. (2008) (b). El Cultivo *in vitro* como herramienta para el aprovechamiento, mejoramiento y conservación de especies del género *Agave*. *Investigación y Ciencia*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México. ISSN 1665-4412. Número 41. Pp: 53-62.
- Durán, M. C. & Núñez, H. G. (2015). Utilización de un sistema de inmersión temporal (SIT) para multiplicar plantas ornamentales de *Agave victoriae-reginae*. Verano de Investigación Científica. Jóvenes en la ciencia. 1 (2).
- Enríquez del Valle J. R., Carrillo C. G. & Rodríguez-de-la-O, J. L. (2005). Sales inorgánicas y ácido indolbutírico en el enraizado *in vitro* de brotes de *Agave angustifolia*. *Revista Fitotecnica Mexicana*. Sociedad Mexicana Fitogenética, A. C. Chapingo, México. 28. Pp: 175-178.
- Flores, N. E. & Muñoz, H. G. (2017). Micropropagación de *Agave durangensis* en un sistema de Inmersión Temporal (SIT). Verano de Investigación Científica. Jóvenes en la ciencia. 3 (1).
- Forster, P. I. (1992). New varietal combinations in *Agave vivipara* (Agavaceae). Brittonia. En: *The New York Botanical Garden*. 44(1). Pp: 74-75.
- García-Mendoza, A. J. & Chiang, F. (2003). The confusion of *Agave vivipara* L. and *A. angustifolia* Haw., two distinct taxa. Brittonia. En: *The New York Botanical Garden Press*. 55 (1). Pp: 82-87.
- García-Mendoza, A. J. & Galván, R. (1995). Riqueza de las familias *Agavaceae* y *Nolinaceae* en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 57. Pp: 7-24.
- García-Mendoza, A. J. (2003). *Agave parrasana*. Revisión de las *Agavaceae* (*sensu stricto*), *Crassulaceae* y *Liliaceae*. Instituto de Biología, UNAM. *SNIB-CONABIO*.

- García-Mendoza, A. J. (2007). Los agaves de México. *Redalyc*. Universidad Nacional Autónoma de México. 14-23.
- García-Mendoza, A. J. (2010). Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* Zucc. (*Agavaceae*): nuevos taxa y neotipificación. *Acta Botánica Mexicana*. 91. Pp: 71-93.
- García-Mendoza, A. J., Franco-Martínez, I. S. y Sandoval-Gutiérrez, D. (2019). Cuatro especies nuevas de *Agave* (*Asparagaceae*, *Agavoideae*) de sur de México. *Acta Botanica Mexicana*. 126: 1462.
- Gentry, H. S. (1982). Agaves of Continental North America. *The university of Arizona Press*.
- Godoy, C. G. & Núñez, H. G. (2015). Micropropagación de *Agave durangensis* en un sistema de Inmersión temporal (SIT). *Verano de Investigación Científica. Jóvenes en la ciencia*. 1 (2).
- Grob, U., Gilles, F., Bender, L., Berghofer, P. & Neumann, K. (1993). The influence of sucrose and an elevated CO₂ concentration on photosynthesis of photoautotrophic peanut (*Arachis hypogaea* L.) cell cultures. *Plant Cell, Tissue, and organ culture*. 33. Pp: 143-150.
- Grout, B. W. W. (1988). Photosynthesis of regenerated plantlets *in vitro*, and the stresses of transplanting. *Acta Horticulturae*. 230. Pp: 128-135.
- Guillot, D., Van der Meer, P., Laguna, E. & Rosselló, J. A. (2009). El Género *Agave* L. En: *la flora alóctona valenciana*. Jolube Editor y Consultor Ambiental.
- Ivanova, M. & Van Staden, J. (2010). Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans. *Plant Growth Regul.* 60. Pp: 143-150. DOI: 10.1007/S10725-009-9430-8
- Jordan, M. & Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores del crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. En: *Fisiología vegetal*. Squeo, F. A. & Cardemil, L. (eds). Ediciones Universidad de La Serena.
- Loyola-Vargas, V. M. & Vázquez-Flota, F. (2006). *Plant cell culture protocols. Methods in molecular biology*. 2a. ed. Centro de investigación Científica de Yucatán. Humana Press. Totowa.
- Lugo, O., Arellano, G. & Hernández, D. (2017). Automatización de un sistema de inmersión temporal con base en plataformas abiertas de hardware y software. *Terra Latinoamericana* 35. Pp: 269-277.
- Miguel Luna, M. E., Enríquez del Valle, J. R., Velasco, V. A., Villegas, Y. & Carrillo, J. C. (2014). Concentración de benciladenina: tipo y dosis de carbohidratos en el medio de cultivo para proliferación de brotes de *Agave americana*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 46 (1), Pp: 97- 107.

- Miguel Luna, M. E., Enríquez del Valle, J. R., Velasco, V. A., Villegas, Y., Carrillo, J. C. & Rodríguez, G. (2013). Composición del medio de cultivo y la incubación para enraizar brotes de Agave. *Revista mexicana de Ciencias Agrícolas*. (6). Pp: 1151-1159.
- Monja-Mío, K. M., Barredo, F., Herrera, G., Esqueda, M. & Robert, M. L. (2015). Development of the stomatal complex and leaf Surface of *Agave angustifolia* Haw. "Bacanora" plantlets during the in vitro to ex vitro transition process. *Scientia Horticulturae*. 189: 32-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.03.032>
- Monja-Mío, K. M., Olvera-Casanova, D., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M. A., Sánchez-Teyer, F. L. & Robert, M. L. (2020). Improving of rooting and ex vitro acclimatization phase of Agave tequilana by temporary immersion system (BioMINT tm). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. The Society for In Vitro Biology. DOI: 10.1007/s11627-020-10109-5.
- Montejo, A. B. & Núñez, H. G. (2016). Utilización de un sistema de inmersión temporal (SIT) para multiplicar plantas ornamentales de *Agave victoriae-Reginae* (T. Moore). Verano de Investigación Científica. 2 (1).
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant*. Vol: 15.
- Niemenak, N., Saare-Surminski, S., Rohsius, C., Omokolo, D. & Lieberei, R. (2008). Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion biorreactor and analyses of free aminoacids in different tissues. *Plant Cell Reports*. Springer-Verlag. DOI: 10.1007/s00299-007-0497-2.
- Ontiveros, F. (2013). *Análisis de la eficiencia de diferentes sistemas de cultivo in vitro en la propagación de agaves* [tesis de maestría, Universidad Autónoma de Aguascalientes].
- Pérez, E., Esparza, M. & Pérez, M. (2012). Conservación in vitro de germoplasma de *Agave spp.* Bajo condiciones de crecimiento retardado. *Revista Fitotécnica Mexicana*. 35 (4). Pp: 279-287.
- Pimienta, E., Muñoz, U. A., Ramírez, B. & Méndez, L. (2006). Desarrollo vegetal. Universidad de Guadalajara. Unidad para el Desarrollo de la Investigación y el Posgrado. P.p. 66-96.
- Pospisilova, J., Tichá, I., Kadlecek, P., Haisel, D. & Plzakova, S. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions [aclimatación a condiciones ex vitro de plantas micropropagadas]. *Biologia plantarum*. 42 (4). Pp: 481-497.

- Reyes-Díaz, J., Arzate-Fernández, A., Piña-Escutia, J. & Vázquez-García, L. (2017). Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. *Industrial Crops & Products*. Elsevier. Pp: 81-85.
- Ríos-Ramírez, S; Enríquez del Valle, J. R., Rodríguez-Ortíz, G., Ruiz-Luna, J. & Velasco-Velasco, V. A. (2018). *In vitro* formation of adventitious shoots on caulinary tissue of physiologically contrasting *Agave angustifolia* plants. *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 30 (1). Pp: 49-56.
- Robert, M. L., Herrera-Herrera, J. L., Castillo, E., Ojeda, G. & Herrera-Alamillo, M. A. (s.f.). an efficient method for the micropropagation of Agave Species. En: Loyola-Vargas, V. M. & Vázquez-Flota, F. *Methods in Molecular Biology*. 318. Plant Cell Culture Protocols. 2a. Humana Press.
- Rocano, M. (2018). *Eficiencia de la multiplicación in vitro de Juglans neotrópica (nogal) en Biorreactores de Inmersión Temporal (BIT)* [tesis de maestría, Universidad de Cuenca].
- Rocha, M., Good-Ávila, S. V., Molina-Freaner, F., Arita, H. T. & Castillo, A. (2006). Pollination biology and adaptive radiation of *Agavaceae*, with special emphasis on the genus agave. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*. V 22, (1). Article 27.
- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora, A. & Acosta-Dueñas, B. (1996). Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 46. Pp: 85-87.
- Rosales, C., Brenes, J., Salas, K., Arce-Solano, S. & Abdelnour-Esquivel, A. (2017). Micropropagación de *Stevia rebaudiana* en sistemas de inmersión temporal para incursionar en la producción hortícola. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 24(1), pp: 69-84. DOI: 10.5154/r.rchsh.2017.08.028
- Santacruz, F., Gutiérrez, H. & Rodríguez, B. (1999). Efficient *in vitro* propagation of *Agave parrasana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 56. Pp: 163–167.
- Santamaría, J. M., Herrera, J. L. & Robert, M. L. (1995). Stomatal physiology of a micropropagated CAM plant; *Agave tequilana* (Weber). *Plant Growth Regulation*. 16. Pp: 211-214.
- Secretaría de Economía. (2016). *Sistema de Información Arancelaria (SIAVI)*. <http://www.economia.gob.mx/?P=2261>.
- SEMARNAT. (2010). *Normal Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental: Especies nativas de México de flora y fauna silvestre: categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio*. Diario Oficial de la Federación.

- Styer, D. J. (1985). Bioreactor technology for plant propagation [tecnología de biorreactores para la propagación de plantas]. En: Henke, R. R. (ed), *Tissue Culture in Forestry and Agriculture*. Pp: 117-130.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2002). *Plant physiology*. Sinahuer Associates, Inc. Publishers. 3a ed.
- Takayama, S. & Akita, M. (2005). Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. En: Hvoslef-Eide, A. K. & Preil, W. (eds.), *Liquid Culture Systems For in vitro Plant Propagation*, pp: 61-78. Springer.
- Takayama, S. & Akita, M. (2008). Bioengineering aspects of bioreactor application in plant propagation. En: Gupta, S. D. & Ibaraki, Y. (eds.), *Plant Tissue Culture Engineering*, pp: 83-100. Springer.
- Teisson, C., Alvarad, D., Berthouly, B., Cote, F., Escalant, J. V., Etienne, H. & Lartaud, M. (1996). Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. *Plant Production in Closed Ecosystems. Acta Horticulturae*. 440. Pp: 521-526.
- Us-Camas, R., Castillo-Castro, E., Aguilar-Espinosa, M., Limones-Briones, V., Rivera-Madrid, R., Robert-Díaz, M. L. & De-la-Peña, C. (2017). Assessment of molecular an epigenetic change in the albinism of *Agave angustifolia* Haw. *Plant Science*. 263. Pp: 156-167.
- Valiente-Banuet, A., Bolongaro-Crevenna, A., Briones, O., Ezcurra, E., Rosas, M., Nuñez, H., Barnard, G. & Vazquez, E. (1991). Spatial relationships between cacti and nurse shrubs in a semi-arid environment in central Mexico. *Journal of Vegetation Science*. 2, pp: 15-20. Opulus press Uppsala.
- Van Huylenbroeck, J. M. & Debergh, P. C. (1996). Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiologia Plantarum*. 96. Pp: 298-304.
- Van Huylenbroeck, J. M., Piqueras, A. & Debergh, P. C. (1998). Photosyntesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. *Plant Science*. 134. Pp: 21-30.
- Vázquez-Elorza, A. (2019). *El agave en México*. Temática socioeconómica. Investigación y Desarrollo. Recuperado de <https://invdes.com.mx/los-investigadores/el-agave-en-mexico-tematica-socioeconomica/>
- Villaseñor, J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. Pp: 559-902.

- Walker, P. N. (1995). Systems analysis and engineering. En: Aitken-Christie, J., Kozai, T. & Smith, M. A. L. (Eds). *Automation and Environmental Control in Plant Tissue Culture* (pp 65-86). Springer.
- Wijnands, D. O. (1983). *The Botany of the Commelins*. A. A. Balkema, Bibliotheek der Landrouwhogeschool Wageningen.
- Yescas, E., Campos, G. V., Enríquez del Valle, J. R., Velasco, V. A., Rodríguez, G. & Ruíz, J. (2016) aclimatación de *Agave americana* var. *Oaxacensis* obtenidas *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7 (4). Pp: 911-922.
- Ziv, M. (1991). Quality of micropropagated plants: vitrification. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 27. Pp: 64-69.
- Ziv, M. (1991). Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. En: Debergh, P. C. y Zimmerman, H. (eds.), *Micropropagation: Technology and Application* (Pp: 45-69). Kluwer, Academic Publishers. DOI: 10.1007/978-94-009-2075-0
- Ziv, M. (1995). The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture. *Acta Horticulturae* 393. Environmental control in plant tissue culture.
- Ziv, M. (2000). Bioreactor technology for plant micropropagation. En: Janick, J. (ed.) *Horticultural Reviews*. Vol. 24. John Wiley & sons.
- Ziv, M. (2005). Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 81. Pp: 277-285. Springer. DOI: 10.1007/s11240-004-6649-y
- Ziv, M., Ronner, G. & Raviv, M. (1998). Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. *In vitro Cellular & Developmental Biology*. Vol: 34. Pp: 152-156.