



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TESIS

**MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES DEL GENERO *Yucca* EN
BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL**

PRESENTA

ROGELIO AXEL CERVANTES OJEDA

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN EL ÁREA DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

TUTOR

Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch

COMITÉ TUTORAL

M. en C. Lucía Isabel Chávez Ortiz

Dra. Alejandra Palomeque Carlín

Aguascalientes, Aguascalientes a 28 de enero 2019



M.C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **ROGELIO AXEL CERVANTES OJEDA** con ID 221327 quien realizó la titulada: **MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES DEL GENERO *Yucca* EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que él pueda proceder a imprimirla, y 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.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 28 de enero de 2019.

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch
Tutor 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.C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como miembro del Comité Tutorial del estudiante **ROGELIO AXEL CERVANTES OJEDA** con ID 221327 quien realizó la tesis titulada: **MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES DEL GENERO *Yucca* EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el VOTO APROBATORIO, para que él pueda proceder a imprimirla, y 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.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 30 de enero de 2019.



M.C. Lucía Isabel Chávez Ortiz
Miembro del Comité Tutorial

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M.C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS

PRESENTE

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **ROGELIO AXEL CERVANTES OJEDA** con ID 221327 quien realizó la tesis titulada: **MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES DEL GENERO *Yucca* EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *él* pueda proceder a imprimirla, y 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 28 de enero de 2019.

Alejandra Palomeque C.
Dra. Alejandra Palomeque Carlín
Comité Tutoral

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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

ROGELIO AXEL CERVANTES OJEDA
MAESTRIA EN CIENCIAS, AREA BIOTECNOLOGIA VEGETAL
P R E S E N T E.

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *Yucca* EN BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

ATENTAMENTE

Aguascalientes, Ags., a 05 de Febrero de 2019

"Se lumen proferre"

EL DECANO

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Ruiz Gallegos'.

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS

c.c.p.- Archivo.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca asignada para realizar los estudios de Maestría.

Al Fondo Mixto CONACYT- Gobierno del Estado de Aguascalientes por el apoyo financiero al proyecto (AGS-2015-02-01-267656)

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el apoyo financiero al proyecto (PIBT-18-2).

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Eugenio Martín Pérez Molphe Balch, MC. Lucia Isabel Chávez Ortiz y Dra. Alejandra Palomeque Carlín, por brindarme siempre su apoyo, confianza, consejos y sabiduría, imprescindibles para que el trabajo experimental y de investigación fuese el mejor.

A los profesores, personal técnico de laboratorio, personal académico y administrativo de la Maestría, por su labor de mantener el nivel del programa elevado.

A mis compañeros de la Maestría por su apoyo, amistad y compañerismo, por hacer más amena y llevadera la carga de trabajo.

A Marthita Pérez, Isaac Reyes, Adilene y Marce, compañeros del Laboratorio de Biotecnología 207 por su apoyo siempre incondicional en el laboratorio y sus consejos siempre útiles.

DEDICATORIAS

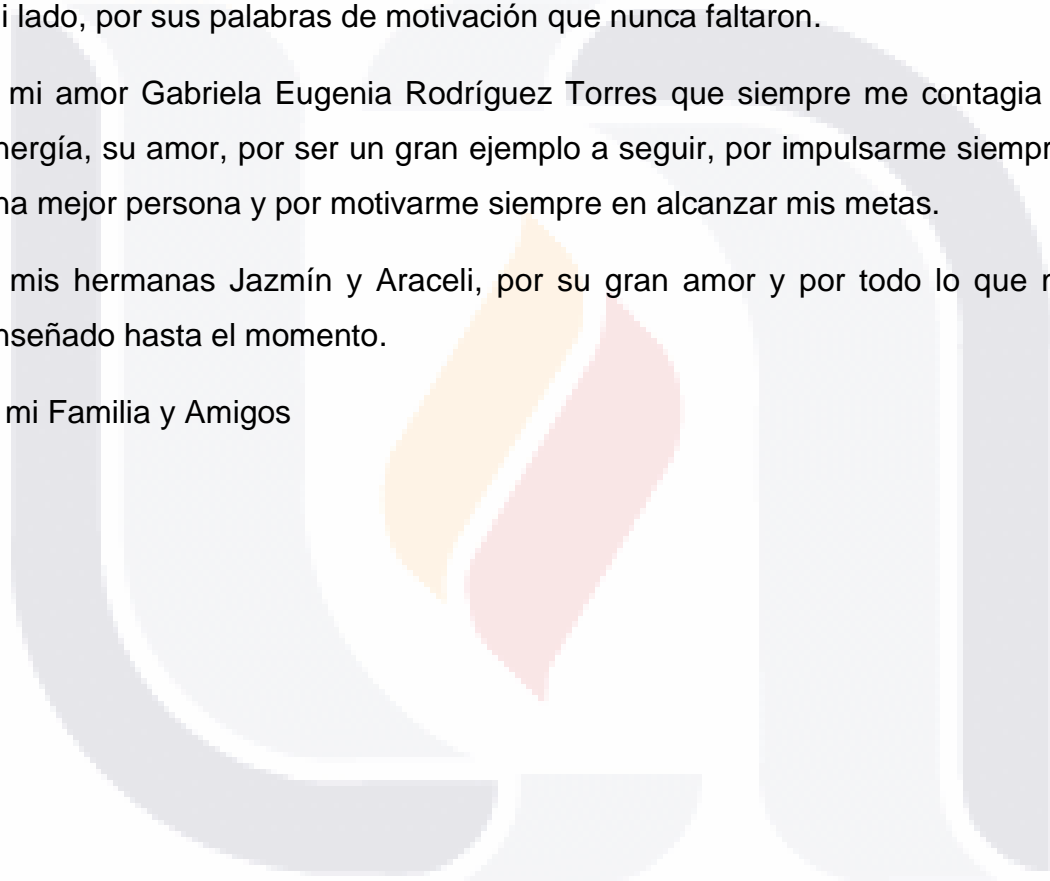
A mi mamá que siempre ha estado pendiente de mí, por su inagotable amor y sus sabios consejos que siempre me motivan a seguir adelante, por ser mi ejemplo a seguir.

A mi papá por su gran apoyo, amor y confianza incondicional, por estar siempre a mi lado, por sus palabras de motivación que nunca faltaron.

A mi amor Gabriela Eugenia Rodríguez Torres que siempre me contagia con su energía, su amor, por ser un gran ejemplo a seguir, por impulsarme siempre a ser una mejor persona y por motivarme siempre en alcanzar mis metas.

A mis hermanas Jazmín y Araceli, por su gran amor y por todo lo que me han enseñado hasta el momento.

A mi Familia y Amigos



INDICE GENERAL

| | |
|---|----|
| INDICE DE TABLAS | 3 |
| INDICE DE FIGURAS | 4 |
| ACRÓNIMOS | 6 |
| RESUMEN | 7 |
| ABSTRACT | 8 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| Descripción de las plantas del género <i>Yucca</i> | 9 |
| <i>Yucca carnerosana</i> | 9 |
| <i>Yucca elata</i> | 10 |
| <i>Yucca filifera</i> | 11 |
| <i>Yucca coahuilense</i> | 11 |
| <i>Yucca periculosa</i> | 12 |
| <i>Yucca filamentosa</i> | 13 |
| Distribución y Ecología | 14 |
| Usos | 14 |
| Saponinas | 15 |
| Situación actual, explotación y grado de amenaza | 15 |
| Micropropagación de especies del género <i>Yucca</i> | 16 |
| Micropropagación y uso de Biorreactores | 17 |
| JUSTIFICACIÓN | 20 |
| HIPÓTESIS DE TRABAJO | 20 |
| OBJETIVO GENERAL | 21 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 21 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 22 |
| Propagación del material vegetal | 22 |
| Multiplicación en sistema semisólido | 22 |
| Obtención de material vegetal | 22 |
| Selección de las especies para evaluar en biorreactores de inmersión temporal | 23 |
| Construcción de biorreactores de inmersión temporal tipo BIT | 23 |

| | |
|--|----|
| Diseño propio..... | 24 |
| Diseño propio escalado | 27 |
| Diseño comercial | 29 |
| Armado | 30 |
| Biorreactor inmersión temporal tipo RITA | 31 |
| Multiplicación en biorreactor de inmersión temporal..... | 32 |
| Etapa de enraizamiento de explantes provenientes de biorreactor de inmersión temporal..... | 33 |
| Etapa de enraizamiento de explantes provenientes del sistema semisólido | 33 |
| Etapa de aclimatación..... | 33 |
| Optimización de multiplicación en biorreactor de inmersión temporal | 34 |
| RESULTADOS..... | 35 |
| Multiplicación en sistema semisólido | 35 |
| Micropropagación en BITS | 36 |
| <i>Yucca elata</i> | 36 |
| Multiplicación en biorreactor de inmersión temporal <i>Yucca elata</i> | 36 |
| Longitud de brotes de <i>Yucca elata</i> | 38 |
| Etapa de enraizamiento de <i>Yucca elata</i> | 40 |
| Etapa de aclimatación de <i>Yucca elata</i> | 41 |
| <i>Yucca coahuilense</i> | 43 |
| Multiplicación en biorreactor de inmersión temporal de <i>Yucca coahuilense</i> ... | 43 |
| Longitud de brotes de <i>Yucca coahuilense</i> | 45 |
| Etapa de enraizamiento de <i>Yucca coahuilense</i> | 47 |
| Etapa de aclimatación de <i>Yucca coahuilense</i> | 49 |
| <i>Yucca periculosa</i> | 50 |
| Multiplicación en biorreactor de inmersión temporal de <i>Yucca periculosa</i> | 50 |
| Longitud de brotes de <i>Yucca periculosa</i> | 52 |
| Etapa de enraizamiento de <i>Yucca periculosa</i> | 54 |
| Etapa de aclimatación de <i>Yucca periculosa</i> | 56 |
| Optimización de multiplicación en biorreactor de inmersión temporal | 57 |
| <i>Yucca elata</i> | 57 |
| <i>Yucca coahuilense</i> | 58 |

| | |
|---|----|
| <i>Yucca periculosa</i> | 59 |
| Etapa de aclimatación de brotes obtenidos en la etapa de optimización de BITs | 60 |
| Perfil de pH en el medio MS líquido de los BITs | 61 |
| Contaminación en biorreactores BITs y RITAs | 62 |
| DISCUSIONES | 64 |
| Construcción de biorreactores de inmersión temporal..... | 64 |
| Diseño propio | 64 |
| Diseño propio escalado | 65 |
| Diseño comercial | 65 |
| Multiplicación en sistema semisólido | 66 |
| Micropropagación en BITs | 67 |
| CONCLUSIONES | 69 |
| REFERENCIAS..... | 71 |
| ANEXO | 1 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Número de raíces y porcentaje de enraizamiento para <i>Yucca elata</i> en biorreactores de inmersión temporal y sistema semisólido..... | 40 |
| Tabla 2. Porcentaje de supervivencia al proceso de aclimatación de <i>Yucca elata</i> | 42 |
| Tabla 3. Número de raíces y porcentaje de enraizamiento para <i>Yucca coahuilense</i> en biorreactores de inmersión temporal y sistema semisólido..... | 49 |
| Tabla 4 Porcentaje de supervivencia al proceso de aclimatación de <i>Yucca coahuilense</i> | 49 |
| Tabla 5. Número de raíces y porcentaje de enraizamiento para <i>Yucca periculosa</i> en biorreactores de inmersión temporal y sistema semisólido..... | 56 |
| Tabla 6. Porcentaje de supervivencia al proceso de aclimatación de <i>Yucca periculosa</i> | 57 |
| Tabla 7. Porcentaje de supervivencia al proceso de aclimatación de los brotes obtenidos en BIT 1/12, BIT 3/12 y BIT 9/12 de las tres especies de <i>Yucca</i> | 61 |

Tabla 8. Contaminación en sistemas de biorreactores BITs diseño propio y comercial y RITAs. 63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de Biorreactores de Inmersión Temporal. 19

Figura 2. Esquema de construcción de biorreactor de inmersión temporal. 24

Figura 3. Conector rápido pasamuro recto..... 27

Figura 4. Diseño propio escalado de biorreactores de inmersión temporal. 28

Figura 5. Válvula solenoide. 28

Figura 6. Diseño comercial biorreactores de inmersión temporal. 30

Figura 7. Multiplicación de brotes por explante en medio MS semisólido. 35

Figura 8. Progreso de producción y crecimiento de brotes de *Yucca elata* en biorreactor de inmersión temporal y semisólido. 37

Figura 9. Producción de número de brotes de *Yucca elata* en biorreactor de inmersión temporal BIT y RITA comparado con el sistema semisólido..... 38

Figura 10. Longitud de los brotes de *Yucca elata* a diferentes BITs. 38

Figura 11. Longitud y cantidad de brotes de *Yucca elata* producidos en BIT con diferentes tiempos de inmersión. 39

Figura 12. Proceso de enraizamiento de *Yucca elata* en biorreactores de inmersión temporal en medio semisólido..... 41

Figura 13. Proceso de aclimatación de *Yucca elata* en peat moss..... 42

Figura 14. Progreso de producción y crecimiento de brotes de *Yucca coahuilense* en biorreactor de inmersión temporal y semisólido. 44

Figura 15. Producción de número de brotes de *Yucca coahuilense* en biorreactor de inmersión temporal BIT y RITA comparado con el sistema semisólido..... 45

Figura 16. Longitud de los brotes de *Yucca coahuilense* a diferentes BITs..... 46

Figura 17. Longitud y cantidad de brotes de *Yucca coahuilense* producidos en BIT con diferentes tiempos de inmersión..... 47

Figura 18. Proceso de enraizamiento de *Yucca coahuilense* en biorreactores de inmersión temporal en medio semisólido. 48

Figura 19. Progreso de producción y crecimiento de brotes de *Yucca periculosa* en biorreactor de inmersión temporal y semisólido. 51

Figura 20. Producción de número de brotes de *Yucca periculosa* en biorreactor de inmersión temporal BIT y RITA comparado con el sistema semisólido. 52

Figura 21. Longitud de los brotes de *Yucca periculosa* a diferentes BITs. 53

Figura 22. Longitud y cantidad de brotes de *Yucca periculosa* producidos en BIT con diferentes tiempos de inmersión. 54

Figura 23. Proceso de enraizamiento de *Yucca periculosa* en biorreactores de inmersión temporal en medio semisólido. 55

Figura 24. Proceso de optimización de *Yucca elata* a mayor tiempo de inmersión en BITs. 58

Figura 25. Proceso de optimización de *Yucca coahuilense* a mayor tiempo de inmersión en BITs. 59

Figura 26. Proceso de optimización de *Yucca periculosa* a mayor tiempo de inmersión en BITs. 60

Figura 27. pH final de *Y. elata*, *Y. coahuilense* y *Y. periculosa* a diferentes tiempos de inmersión en BITs. 62

ACRÓNIMOS

2iP: Isopenteniladenina

ANA: Ácido naftalenacético

BA: Bencilaminopurina

BIT: Biorreactor de Inmersión Temporal de tanques gemelos

FDA: Administración de alimentos y medicamentos, siglas en inglés

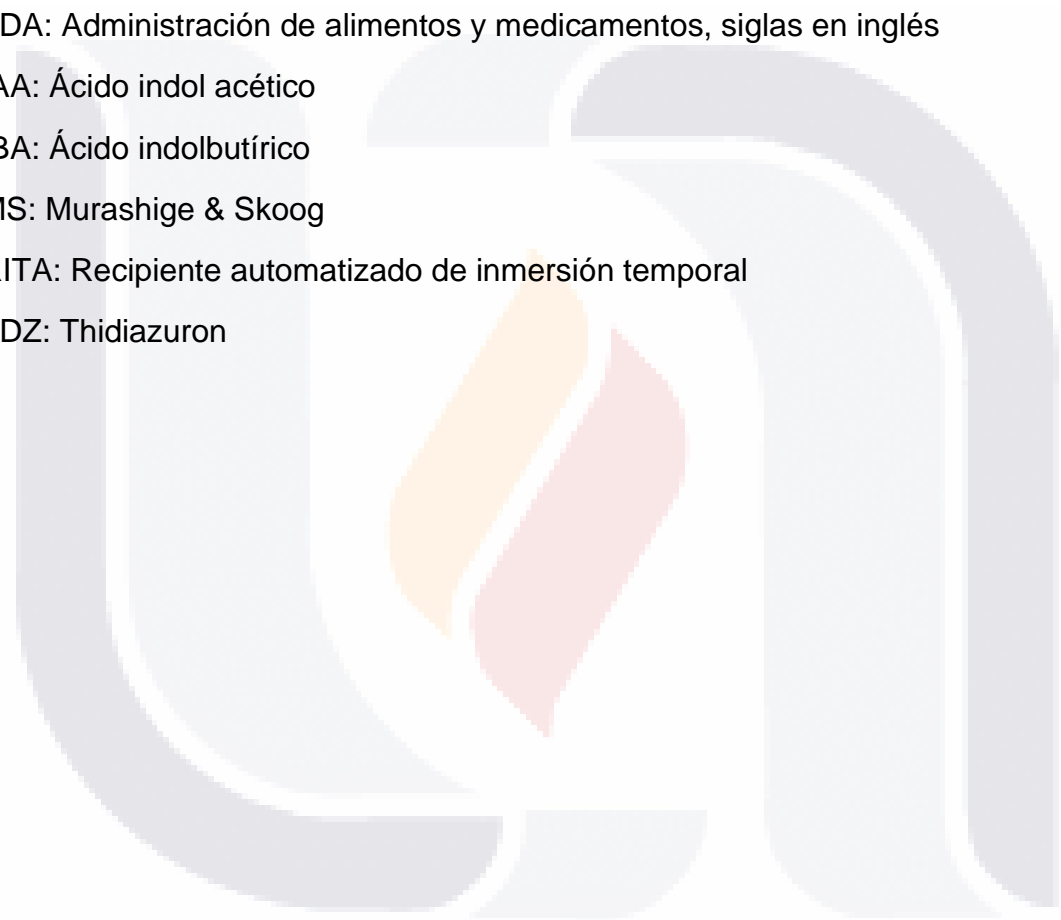
IAA: Ácido indol acético

IBA: Ácido indolbutírico

MS: Murashige & Skoog

RITA: Recipiente automatizado de inmersión temporal

TDZ: Thidiazuron



RESUMEN

Las especies del género *Yucca* son plantas que crecen en climas desérticos y semidesérticos de nuestro país, tienen la capacidad adaptarse a condiciones de estrés hídrico. Se trata de especies con múltiples usos, pero difíciles de propagar por métodos convencionales. Por este motivo se planteó este trabajo cuyo objetivo fue desarrollar protocolos eficientes para la propagación *in vitro* de estas plantas. Primero se realizó un análisis de la micropropagación en medio semisólido, se seleccionaron las tres especies con mayor productividad de brotes nuevos. Las cuales fueron en orden descendente *Y. elata*, *Y. coahuilense* y *Y. periculosa*. Las tres especies fueron estudiadas en dos diferentes diseños de biorreactores de inmersión temporal, tanques gemelos y RITA, en tres diferentes condiciones de operación, una inmersión de 1 minuto cada 12 horas (BIT 12 y RITA 12), una inmersión de 1 minuto cada 24 horas (BIT 24 y RITA 24) y una inmersión de 1 minuto cada 36 horas (BIT 36 y RITA 36). Los experimentos de BIT se realizaron por duplicado mientras que los RITA se realizó un solo experimento, y se utilizó medio líquido MS, el mismo regulador de crecimiento vegetal utilizado para cada especie en medio semisólido, durante 30 días, fotoperiodo 12 h luz 8 h oscuridad. Los mejores resultados obtenidos para cada especie fueron en BIT 12 con 10.8, 4.5 y 3.0 brotes por explante en *Y. elata*, *Y. coahuilense* y *Y. periculosa* respectivamente. Los RITAs no lograron mejorar los resultados en sistema semisólido con *Y. elata* y *Y. periculosa*, pero con *Y. coahuilense* en RITA 24 se obtuvieron 6.0 brotes por explante. Enseguida se sometieron a un proceso de enraizamiento en medio semisólido sin reguladores de crecimiento vegetal, para después trasplantarlos a suelo en condiciones de invernadero. La mejor condición de operación para las tres especies fue BIT12, así que se intentó optimizar este experimento aumentando el tiempo de inmersión a 3 y 9 minutos cada 12 horas. Solamente en el caso de *Y. coahuilense* si hubo un aumento en la productividad en BIT3/12 con 12.5 brotes por explante. La desventaja con estos últimos experimentos fue que los explantes se vitrificaban. Otro aspecto relevante de esta investigación es que se trabajó en mejorar el diseño de los BITs utilizando componentes innovadores.

ABSTRACT

The species of the genus *Yucca* are plants that grow in desert and semi-desert climates of our country, they have the ability to adapt to water stress conditions. They are species with multiple uses, but difficult to propagate by conventional methods. For this reason, our whose objective was to develop efficient protocols for the *in vitro* propagation of these plants. First, an analysis of the micropropagation in semisolid medium was carried out. The three species with higher productivity of new shoots were selected. These were *Y. elata*, *Y. coahuilense* and *Y. periculosa* in descending order. The three species were studied in two different temporary immersion bioreactors, twin tanks and RITA, under three different operating conditions, a) a single one minute immersion every 12 hours (BIT 12 and RITA 12), b) a single immersion one minute every 24 hours (BIT 24 and RITA 24) and c) a single one minute immersion every 36 hours (BIT 36 and RITA 36). The BIT experiments were carried out in duplicate while the RITA experiments were carried out in a single experiment, with liquid MS medium, the same plant growth regulator used for each species in semi-solid medium, was used for 30 days, photoperiod 12 h light 8 h dark. The best results obtained for each species were in BIT 12 with 10.8, 4.5 and 3.0 shoots per explant in *Y. elata*, *Y. coahuilense* and *Y. periculosa* respectively. The RITAs were not able to improve the results obtained in the semisolid system in *Y. elata* and *Y. periculosa*, but did for *Y. coahuilense* in RITA 24, where 6.0 shoots were obtained per explant. They were then set up to a process of rooting in semi-solid medium without plant growth regulators, and then transplanted to soil under greenhouse conditions. The best operating condition for the three species was BIT12, so we tried to optimize this experiment by increasing the immersion time to 3 and 9 minutes every 12 hours. Only in the case of *Y. coahuilense* there was an increase in productivity in BIT3 / 12 with 12.5 shoots per explant. The disadvantage with these latter experiments was that the explants vitrified. Another relevant aspect of this research is that we worked on improving the design of the BITs using innovative components.

INTRODUCCIÓN

Descripción de las plantas del género *Yucca*

Las plantas del género *Yucca*, pertenece a la familia *Asparagaceae* y a la subfamilia *Agavoideae*. Son propias de regiones tropicales o subtropicales, han sido encontradas en zonas áridas o semiáridas del suroeste de Estados Unidos y México (Bononi *et al.* 2013). Son capaces de proliferar en condiciones adversas de altas como temperaturas, estrés hídrico y radiación solar alta, mientras que los cultivos anuales son difíciles de cultivar en estas condiciones (Maiti y Rodríguez 2011).

Las *Yuccas* son árboles perennes, en algunas ocasiones arbusto (Mellado *et al.* 2009). Sus hojas crecen de forma ascendentes, rígidas, fibrosas, planas y con forma convexa y pueden tener los extremos planos, dentados o fibrosos; la hoja termina en forma de un ápice agudo. Las inflorescencias son una panícula erecta o colgante. Las flores son campanuladas o globosas con cinco pétalos, curvados y libres, a veces unidos en el caso de los segmentos. El ovario es superior y trilocular con numerosos óvulos en la placentación axilar. El fruto no se abre al llegar a la madurez (indehiscente) o bien puede abrirse de forma espontánea para dispersar su contenido (dehiscente) si es una cápsula; la semilla tiene forma plana y un color negro brillante u opaco (Maiti y Rodríguez 2011).

Yucca carnerosana

Yucca carnerosana es nombrada así debido a la localidad “Carneros” en Coahuila, México. También es conocida como palma ixtle o palma samandoca, otros sinónimos son *Yucca australis* Trel. y *Samuela carnerosana* Trel. Esta planta tiene la capacidad de producir inflorescencias comestibles una vez al año en la primavera, entre marzo y abril, que es una estación seca. Los bovinos y berrendos se alimentan de las inflorescencias de las *Yuccas*. Dichas inflorescencias son cosechadas y son usadas como reserva de forraje para el ganado en temporadas de sequía (Mellado *et al.* 2009). Se encuentra distribuida en los Estados de Coahuila, Chihuahua,

Zacatecas, San Luis Potosí, Nuevo León y Tamaulipas, dentro de estos lugares puede observarse en laderas con pendientes suaves o fuertes, sobre sustratos con piedra caliza, y en altitudes que van desde 1000 y 2200 m. Esta planta se encuentra asociada con *Yucca torreyi* y *Yucca rostrata*. Es una planta que tiene bien definido y desarrollado su tallo. En ocasiones puede desarrollar agrupaciones de troncos que crecen desde su base, el tronco principal puede llegar a medir entre 1.5 a 6 metros de altura. Sus hojas pueden llegar a medir de 50 a 100 cm de longitud con una anchura de 5 a 7.5 cm, estas son rígidas, son de color verde-azulado, en su margen con gruesas fibras. Sus flores son extendidas miden entre 4.5 a 9 cm, los pétalos pueden medir entre 6.5 a 9.3 cm de largo con 2 a 2.8 cm de ancho. Su fruto tiene forma oblonga con unas medidas de 5 a 7.5cm de longitud y 4 cm de ancho, las semillas tienen forma plana o hemisféricas con textura rugosa con unas medias de 7 a 9 mm de largo por 8 a 10mm de ancho (Guillot Ortiz y Van Der Meer 2008).

Yucca elata

El nombre común que se le da a esta planta es Sudworth, *Yucca elata* proviene del latín *elatus* que significa elevado haciendo referencia a su vástago floral. Así también se le conoce por sus diferentes sinónimos, *Yucca angustifolia* var. *elata* Engelm, *Yucca angustifolia* var. *radiosa* Engelm, *Yucca radiosa* (Engelm) Trel, y *Yucca constricta* Baker. Se encuentra distribuida al norte de México en el estado de Chihuahua, en Estados Unidos en los estados de Arizona, Nuevo México y Texas. *Yucca elata* es una planta arborescente, se puede encontrar como planta solitaria como también formando grupos, su tallo principal puede medir entre 0.9 a 4.5 m de altura, puede tener de 1 a 5 ramas pequeñas orientadas hacia arriba, cuando no se encuentra ramificada que es poco común puede llegar a medir hasta 7.8 m de altura. Sus hojas son simétricas de largo pueden medir de 30 a 95 cm y de ancho de 0.4 a 2.5 cm, su forma es lineal plano-convexa, estriada y flexible, de color verde claro con un margen claro y finamente filífero. Contiene numerosas flores de forma campanuladas o globosas con un color beige y en ocasiones verdosas o rosa claro

Su floración se realiza entre los meses de mayo a junio (Guillot Ortiz y Van Der Meer 2008).

En *Yucca elata* se ha estudiado ampliamente el papel importante que tiene *Tegeticula yuccasella* de la familia *Prodoxidae* en el proceso de polinización, esta polilla ovípara en las inflorescencias de la planta. Ambas especies resultan beneficiadas por esta interacción (James *et al.* 1993).

Yucca filifera

Esta especie de *Yucca* crece ampliamente a través de las regiones semiáridas del centro y norte de México, al igual que otras especies del mismo género también es polinizada por *T. yuccasella*, el lepidóptero encuentra aptas las condiciones de las semillas de esta planta para que sus huevecillos generen un nuevo individuo y a su vez poder polinizar otras plantas de *Yucca* (Rentería y Cantú 2003).

La polinización de las especies del género *Yucca* se llevan a cabo de forma entomófila simbiótica de forma general a través de un lepidóptero proveniente del género *Promuva tegeticula* o *Yuccela trel*, estos insectos tienen la característica de que se desarrollan dentro del fruto (James *et al.* 1993; Massey y Hamrick 1999). Esto es debido a que el insecto incuba sus huevos en el ovario, de esta forma pueden transportar el polen desde las anteras al estigma. En ambientes favorables y naturales durante cada periodo de floración se pueden producir las suficientes semillas fértiles para asegurar la especie de forma sexual, y a través de los ápices de los tallos de forma asexual (Maiti y Rodríguez 2011).

Yucca coahuilense

Las plantas de esta especie *Y. coahuilense* se encuentran como su nombre lo dice, en México y en especial en el estado de Coahuila, donde es posible verlas crecer sobre planicies con suelos secos de color claro bajo los cuales se puede encontrar

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

un subsuelo rico de arcillas. Además, también se puede encontrar sobre matorral tamaulipeco que es una vegetación arbustiva espinosa y caducifolia, y este sobre suelos arenosos y pedregosos. Así como en Estados Unidos en el condado de Maverick en el Estado de Texas, se puede encontrar asociada con *Yucca treculiana* y *Opuntia* spp. sobre arbustos xerofíticos bajos.

Yucca coahuilense es una planta acaulescente (sin tallo), con gran cantidad de hojas, sus hojas pueden tener una longitud entre 73 y 80 cm y con una anchura de 1 y 1.2 cm, tienen una forma cóncavo-convexas, su margen es color blanco-grisáceo, y ligeramente filífero; sus inflorescencias llegan a medir de 2.2 a 2.5 m de largo. En la parte de la flor los segmentos del perianto son de color blanco, con forma lanceolados u ovalanceolados con una longitud de 4 cm por 1.2 a 1.6 cm de ancho; su filamento con una longitud de 12 a 15 mm, su ovario pubescente y cilíndrico con 22 mm de largo, estilo corto con seis lóbulos. Su fruto es de tamaño grande con forma globosa y con unos 7 cm de largo por 3.5 cm de diámetro. La temporada de floración se realiza entre los meses de mayo y junio (Guillot Ortiz y Van Der Meer 2008).

Yucca periculosa

El nombre común de *Yucca periculosa* es "Izote". Sus sinónimos son *Y. baccata periculosa* Baker, *Y. circinata* Baker, *Y. baccata circinata* Baker, *Y. aloifolia* Karsten & Stahl. La especie se puede localizar en los estados de Puebla, Oaxaca, Veracruz y Tlaxcala, aunque las mayores poblaciones de individuos se observaron en el Municipio de Tehuacán, Puebla, en donde se encontraron 50 individuos por hectárea. Además, los individuos de talla mayor se han encontrado en el municipio de Mitla en Oaxaca. Donde se puede encontrar en planicies y valles con altitudes de 1300 a 1650 m, sobre suelos delgados y pedregosos en laderas con ligera inclinación, aquí forma parte del matorral desértico. Se describe como una planta arborescente con muchas ramificaciones, ramas ascendentes, en algunas ocasiones puede alcanzar una altura de 15 m. Sus hojas llegan a medir entre 35 y

50 cm de longitud y 2 a 3.5 cm de ancho, hojas glabras (sin vello), de forma oblonga o linear-lanceoladas, con borde finamente fibroso. Las mismas hojas llegan a cubrir el escapo, su panícula en forma ovoide puede crecer hasta 1 m de altura en dirección vertical. Sus flores extendidas en segmentos del perianto con pubescencia con 3.5 cm de alto por 1 a 1.2 cm de ancho. Su fruto tiene forma oblonga, es colgante, mide de 5 a 8 cm por 2.5 a 3.2 cm de diámetro. La temporada de floración va a depender del lugar y su altitud, en el caso de Tehuacán su floración se lleva a cabo entre marzo y abril, mientras que en Perote se realiza entre julio y agosto.

Yucca filamentosa

Como su nombre lo indica *Yucca filamentosa* hace referencia a la gran cantidad de fibras filamentosas que sobre salen del margen de su hoja. Esta especie la podremos encontrar en diferentes estados de los Estados Unidos, como New Jersey, Maryland, Virginia, West Virginia, North Carolina, Tennessee. South Carolina, Florida, Alabama, Mississippi y Louisiana.

Es una planta que se caracteriza por no tener tallo, se oculta con sus propias hojas cuando se encuentra presente. Crece en forma de rosetas estoloníferas y a su vez formando grupos, sus hojas crecen rectas extendidas y recurvadas, estas tienen forma oblanceoladas y muy flexibles, las hojas son menos anchas en la parte de la base, así mismo se estrechan considerablemente en dirección al ápice. Pueden llegar a medir de 50 a 75 cm de largo y 2 a 4 cm de ancho. Tienen un color verde y en ocasiones verde claro. En los márgenes de las hojas se encuentran enrolladas en el ápice, en el resto de la hoja se divide en fibras fuertes y rizadas. Sus inflorescencias pueden medir 4.5 m, sus flores son péndulas y de forma campanulada llegan a medir entre 5 y 7 cm. Los tépalos tienen forma mucronulada con una medida de 5 a 7 cm de largo, con un color de verde, amarillo o beige. Su fruto es seco en forma de cápsula oblonga midiendo entre 3.8 a 5 cm de largo y 2

cm de ancho. Sus semillas son delgadas, planas y aladas con una medida promedio de 6 mm (Guillot Ortiz y Van Der Meer 2008).

Distribución y Ecología

Del género existen alrededor de 47 especies de las cuales 29 crecen en condiciones áridas y semiáridas en México, excepto las especies *Y. elepantes*, *Y. aloifolia* y *Y. lacandonica* las cuales se desarrollan en climas húmedos. En América crecen al noreste de EE. UU., México y algunas regiones en Centroamérica. Específicamente en México crecen en los estados de San Luis Potosí, Zacatecas, Tamaulipas, Coahuila, Nuevo León, Durango, Chihuahua y Baja California (Maiti y Rodriguez 2011; Mellado *et al.* 2009).

Las plantas crecen en colinas, en laderas y sumideros, sobre suelos de profundidades variables entre 8 cm y 1 m, cuando el suelo se encuentra seco puede ser de los siguientes colores: café oscuro, pálido, grisáceo o gris oscuro, marfil oscuro o rojizo oscuro, negro y rojo-amarillento. Los valores de pH pueden variar entre 6.8 y 8.4, así como el porcentaje de materia orgánica y nitrógeno se puede encontrar entre los rangos de 1 a 13% y 0 hasta 1% respectivamente. Las plantas del género *Yucca*, específicamente *Y. filifera* y *Y. carnerosana*, crecen en regiones áridas de México se caracterizan porque son capaces de crecer en condiciones extremas de altas y bajas temperaturas y con una precipitación anual máxima de 400 mm (Maiti y Rodriguez 2011).

Usos

A partir de *Yucca carnerosana* y otras 25 especies se pueden obtener fibras de alta calidad y resistencia, debido a su interés para obtención de este recurso los individuos silvestres se encuentran bajo una constante amenaza de gran explotación (Maiti y Rodriguez 2011).

La fibra es usada para lavar trastes y la construcción de casas. Las hojas secas y troncos son usados para prevenir la erosión del suelo en tierras agrícolas montañosas (Maiti y Rodriguez 2011). *Yucca* constituye una fuente renovable para la subsistencia de granjeros en estas regiones.

Según datos emitidos por la FDA (*Food and Drug Administration*) de los Estados Unidos indican que los compuestos obtenidos de las especies de *Yucca* son considerados inocuos para el consumo y uso humano. Pero desde tiempos remotos los nativos de las regiones endémicas de la *Yucca* han utilizados sus extractos como medicina tradicional con el propósito de curar enfermedades, artritis y reumatismo. El proceso para obtener dichos extractos es macerar y prensar mecánicamente los troncos de la planta, después la savia se calienta hasta evaporar, y el resultado es empleado para alimentos, cosméticos, medicamentos, alimento para ganado. Debido a su alto contenido en compuestos fenólicos el extracto tiene propiedades antiinflamatorias (Bononi *et al.* 2013).

Saponinas

Las saponinas son compuestos glucósidos con un núcleo soluble en grasa (aglicona) que puede tener estructura triterpénica (C30) como en las especies de soya, alfalfa, quillaja y guar, o esteroide alcaloide (C27) como en *Yucca*, jitomate y avena. Se ha encontrado en las saponinas propiedades hemolítica y antibacteriana, las cuales pueden tener aplicaciones farmacológicas. Ha sido demostrado en *Yucca schidigera* contiene saponinas esteroideas con actividad anti levadura, estas saponinas han sido estudiados para obtener nuevas aplicaciones para evitar la descomposición de los alimentos (Bononi *et al.* 2013).

Situación actual, explotación y grado de amenaza

Las especies del género *Yucca* se encuentra constantemente afectadas por la actividad humana debido a su explotación del material vegetal para diferentes usos.

En el caso de *Yucca elata* se ve afectada su reproducción y estructura de población debido al pastoreo de ganado (Maiti y Rodriguez 2011). *Yucca periculosa* es afectada por las poblaciones nativas que habitan su ecosistema, es utilizada como fuente de madera, las hojas las usan para hacer artesanías y la flores como alimento (Torres *et al.* 2003).

Micropropagación de especies del género *Yucca*

Los cultivos de tejidos vegetales son una serie técnicas que nos permite tener aislado una célula, tejido u órgano de nuestra planta en estudio en condiciones asépticas libres de contaminantes que puedan poner en riesgo la integridad del cultivo, además podemos proporcionar al cultivo las condiciones físicas como luz y temperatura y condiciones químicas como micro y macronutrientes de forma controlada para poder potenciar o inducir las características que se deseen.

Los primeros estudios que se han realizado en tema de micropropagación con especies del género *Yucca* han sido Kaneda y colaboradores (1987) en donde realizan cultivos de tejidos vegetales de *Yucca shidigera* con el objetivo de analizar los compuestos esteroidales en esta especie; utilizaron explantes de raíces, cultivos de células en suspensión, además evaluaron cinco diferentes reguladores de crecimiento con el propósito de obtener una mayor concentración de sapogenina pero no observaron ningún aumento.

Bentz y col. (1988) realizaron un estudio con *Yucca glauca* en donde llevaron seis experimentos en cultivos *in vitro*, en el primero experimento realizaron cultivos con BA, ANA y tejidos heridos, durante 4 semanas; el segundo experimento fue evaluar la estabilidad del cultivo después de haber sido observado el primer experimento, durante 12 semanas; para el tercer experimento se elevaron las concentraciones de los reguladores de crecimiento vegetal BA y ANA; en el cuarto experimento realizaron una comparación entre dos reguladores de crecimiento vegetal: BA y 2iP

(isopenteniladenina); en el quinto experimento se realizaron cultivos con tres genotipos, el original y otros dos diferentes utilizando los reguladores de crecimiento vegetal empleados en el segundo experimento; en el sexto y último experimento fue observar el proceso de enraizamiento empleando IBA (ácido indolbutírico) y ANA añadidos al medio basal.

Atta-Alla y Van Staden (1997) realizaron un trabajo de micropropagación de *Yucca aloifolia*, utilizaron medio MS con 3% de sacarosa y 0.2% de gelrite, experimentaron combinando BA con ANA y TDZ (thidiazuron) con ANA como reguladores de crecimiento vegetal a diferentes concentraciones. Después de la propagación se enraizaron *in vitro* y por último aclimatados a suelo.

En el trabajo de Arce-Montoya y col. (2006) el objetivo fue evaluar el establecimiento de cultivos *in vitro* y de métodos tradicionales con *Yucca valida*. Para el material vegetal partieron de semillas colectadas de plantas en campo, una vez desinfectada la superficie se cultivaron en medio semisólido MS sin reguladores de crecimiento vegetal, en paralelo se colocaron otras semillas en bandejas con papel absorbente como soporte, humedeciendo el papel con agua cuando fuese necesario para mantener la humedad. Después de germinados se cortaron raíz y hojas dejando solamente meristemas basales que fueron subcultivados en medio MS con 1 μ M IAA y BA 5 μ M como reguladores de crecimiento vegetal durante tres semanas, en simultaneo se utilizaron subcultivos en MS sin reguladores de crecimiento vegetal. Para la etapa de enraizamiento se subcultivaron en medio semisólido MS sin reguladores, después de tres semanas evaluaron la formación de raíz y crecimiento. Los explantes con raíces se trataron con fungicida y fueron transferidos a charolas con plástico utilizando diferentes sustratos.

Micropropagación y uso de Biorreactores

El cultivo de tejidos vegetales o también nombrada propagación *in vitro* (que en latín significa en vidrio), debido a que se realizan en condiciones de asepsia y estériles en

frasco de vidrio o plástico transparente. Dicha técnica se basa en cultivar un inóculo de tejido vegetal con las capacidades diferenciación en condiciones asépticas en un medio de cultivo con nutrientes y reguladores de crecimiento vegetal específicos. Los tejidos vegetales tienen la particularidad de poder generar tejidos, órganos y plantas completas. Esta técnica de multiplicación vegetativa o asexual, los individuos descendientes tienen las mismas características fenotípicas de su planta progenitora, esto es una gran ventaja ya que podemos conservar los fenotipos de interés (Abdelnour-Esquivel y Vicent Escalant 1994).

El principal objetivo de la aplicación de los biorreactores es de proveer las condiciones óptimas de crecimiento a través de regular los parámetros físicos y químicos con la finalidad de alcanzar el máximo rendimiento y calidad de propágulos, además con la probabilidad de mantener los costos de producción bajos automatizando el proceso. Para esto existen diversos tipos de diseños con diferentes aplicaciones. Los sistemas de inmersión temporal están diseñados para que el tejido vegetal permanezca sumergido en medio líquido durante ciertos periodos establecidos por el usuario alternados con periodos en el aire, este sistema fue descrito por Steward *et al.* (1952) citado por (Hvolslef-Eide y Preil 2005).

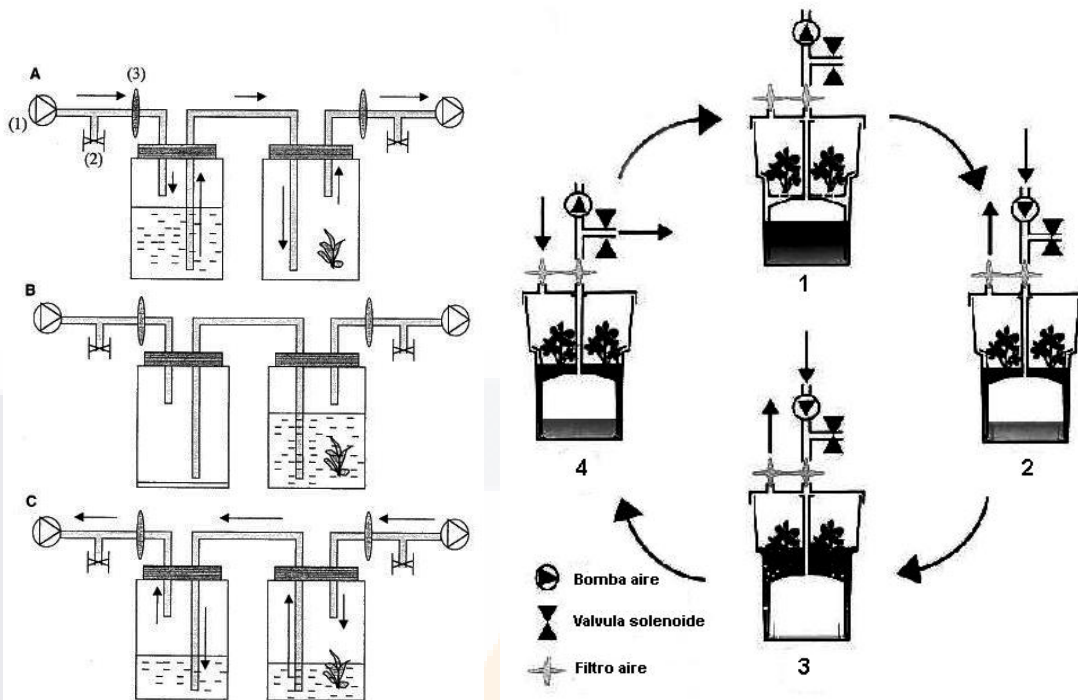


Figura 1. Esquema de Biorreactores de Inmersión Temporal.

En la parte izquierda BIT (1) Línea de aire comprimido (2) Válvula solenoide (3) Filtro hidrofóbico 0.2µm A) El medio líquido está en su tanque de almacenamiento y a través de aire comprimido se trasladado hacia el tanque donde se encuentran los explantes. B) El explante permanece sumergido en el líquido durante el tiempo que se dejó configurado. C) El aire comprimido regresa el medio líquido a su tanque de almacenamiento pasado el tiempo de inmersión (Escalona *et al.* 1999). En la parte derecha RITA su funcionamiento 1) El biorreactor está en reposo el medio de cultivo se encuentra en la cámara inferior. 2) Se comienza a bombear aire para que el líquido comience a subir. 3) El medio líquido permanece en la cámara de los explante el tiempo programado de inmersión. 4) Se termina el bombeo de aire y el líquido comienza a bajar por gravedad (Albard, Cote, y Teisson 1993).

Actualmente no hay trabajos publicados de biorreactores de inmersión temporal relacionados con especies del género *Yucca*.

JUSTIFICACIÓN

El presente proyecto proporcionará al acervo bibliográfico de la biotecnología vegetal información importante y actualizada referente a la propagación *in vitro* de especies del género *Yucca* empleando biorreactores de inmersión temporal con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas con mayores rendimientos de producción de plantas nuevas.

La *Yucca* es considerada una de las agaváceas que se han visto afectadas por las actividades del hombre, debido al desplazamiento de sus regiones nativas para ser aprovechadas en tierras de cultivo consideradas de menor valor. En las regiones áridas el número de especies escasea debido a que es utilizada como leña y la demanda es mayor que la capacidad de regenerarse naturalmente, provocando la principal desertificación (López Flores 1988).

A través del uso de tecnologías como biorreactores de inmersión temporal se puede aumentar el rendimiento de la producción en especies del género *Yucca*, de igual manera se puede reducir los costos de producción, para que puedan ser implementados como sistemas de regeneración de germoplasma en regiones afectadas por las actividades intensivas del ser humano.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El empleo de biorreactores de inmersión temporal en la propagación *in vitro* de especies del género *Yucca*, bajo condiciones óptimas de operación, es capaz de mejorar los rendimientos de producción de nuevas plantas con respecto a los métodos convencionales basados en medios semisólidos.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una metodología de micropropagación para especies del género *Yucca* probando diferentes condiciones en biorreactores de inmersión temporal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Propagar *in vitro* especies del género *Yucca* usando los protocolos convencionales con medio semisólido. Esto con el fin generar el material vegetal necesario para las siguientes fases del trabajo, además de conocer la eficiencia de este sistema.
2. Implementar una metodología de propagación *in vitro* con biorreactores de inmersión temporal diseñado para especies del género *Yucca*.
3. Optimizar las condiciones y parámetros de los biorreactores de inmersión temporal para la producción de brotes y comparar su eficiencia con la propagación *in vitro* convencional en medios semisólidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Propagación del material vegetal

Para comenzar con los experimentos fue necesario multiplicar de forma *in vitro* las seis especies del género *Yucca*. Estas fueron *Yucca carnerosana*, *Yucca filamentosa*, *Yucca filifera*, *Yucca elata*, *Yucca periculosa* y *Yucca coahuilense*, con la finalidad de tener suficiente material vegetal para poder trabajar en los siguientes experimentos. El material inicial se tomó del Banco de Germoplasma *in vitro* de especies de zonas áridas de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Después para preparar 1 L de medio semisólido MS se tomó 1 mL de la solución A, 1 mL de solución B, 2.5 mL de solución C, 2.5 mL de solución D, 5 mL de solución E y 10 mL de solución F; además 30 g de sacarosa, 1.9 g de Nitrato de potasio, 1.65 g de Nitrato de amonio, se ajustó el pH a 5.7 con soluciones de NaOH y HCl, después se agregó 8 g de agar como gelificante.

Multiplicación en sistema semisólido

Para la multiplicación de brotes se cultivaron las seis especies en medio MS con reguladores de crecimiento vegetal. *Yucca carnerosana* y *Yucca filifera* con $3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de m-Topolina; *Yucca periculosa* y *Yucca filamentosa* con $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido indol acético y $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Bencilaminopurina; *Yucca elata* y *Yucca coahuilense* con $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Bencilaminopurina. Las concentraciones de los reguladores de crecimiento vegetal fueron seleccionados basados en el trabajo reportado por López-Ramírez en 2014.

Obtención de material vegetal

El material vegetal que se utilizó estaba previamente establecido *in vitro*, el cultivo se realizó en condiciones de asepsia en campana de flujo laminar, la parte del tejido

que se sembró fue el meristemo basal, realizando un corte del tejido foliar aproximadamente de 3 cm por encima de la base del meristemo. Se sembraron dos tejidos por frasco de 500mL con aproximadamente 80mL de medio MS con su respectivo regulador de crecimiento vegetal según la especie a evaluar.

Los cultivos se incubaron en cuarto de cultivo en condiciones de temperatura controlada a 24°C, luz artificial fluorescente con fotoperiodo de 16h luz y 8h de oscuridad.

Selección de las especies para evaluar en biorreactores de inmersión temporal

Después de un período de incubación de 30 días los explantes se evaluaron las siguientes características: número de brotes por explante longitud del brote y apariencia del tejido. A partir de los resultados obtenidos de la observación de cultivos *in vitro* en medio semisólido, se pudo escoger tres especies de las cuales se van a evaluar en la siguiente etapa de cultivos en biorreactores de inmersión temporal con la finalidad de mejorar la multiplicación de brotes por explante.

Construcción de biorreactores de inmersión temporal tipo BIT

Uno de los problemas de trabajar con biorreactores es mantener las condiciones de esterilidad, así como la dinámica de los fluidos. Por ello se decidió realizar una construcción de biorreactores que pueda solucionar este problema. La parte crítica del diseño de los biorreactores son las conexiones, ya que por este lugar se llevan a cabo las pérdidas de presión y fugas de líquido debido al incorrecto sello que se tiene. Se probaron diferentes tipos de conectores distribuidos en el mercado y el que cumplió con las características que nosotros buscábamos fue un conector tipo pasamuros, el material del conector es latón con un recubrimiento de níquel, este material garantiza soportar las temperaturas de esterilización en autoclave y evita su corrosión por agentes químicos y humedad figura 2.



Figura 2. Esquema de construcción de biorreactor de inmersión temporal.

En los biorreactores se utilizaron frascos de un litro cilíndricos verticales, tapas de polipropileno, mangueras de poliuretano, filtros de aire con diámetro de poro de $0.45\mu\text{m}$, conectores pasamuros, una bomba aire para pecera y soporte de polipropileno para los explantes.

Diseño propio

El diseño de biorreactores de inmersión temporal utilizado fue el de tanques gemelos referido en la figura 1. En las primeras pruebas de cultivos se utilizaron los biorreactores con los que se contaba en el laboratorio, diseñados y armados para otros experimentos, pero debido a que estos presentaban fugas en sus conexiones se contaminaban con facilidad y también su operabilidad era difícil. Por esta razón se decidió buscar mejorar las conexiones, mangueras y armado de estos, con la finalidad de un sistema aséptico, libre de fugas.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Para los tanques gemelos se utilizaron recipientes de vidrio con capacidad de un litro, estos son muy convenientes debido a que son resistentes a las condiciones de esterilización en autoclave, como es un material traslucido permiten la transferencia de luz a los tejidos, es una barrera física con el exterior que asegura la asepsia del cultivo y además se puede observar el progreso del experimento.

La parte interna inferior de los frascos de vidrio es convexa era muy común observar medio líquido MS remanente en el fondo del tanque que contenía los explantes en cuestión, esto ocasionaba que los explantes continuaran en contacto con el medio líquido provocando que los tiempos de inmersión fuesen mayores que los planteados en los experimentos. Debido a este error en el diseño del tanque se innovó un soporte capaz de poner en contacto el explante con el medio líquido solamente el tiempo de inmersión para el que fue establecido. Fue construido a partir de un plástico resistente a las condiciones de esterilizado por autoclave e inerte al sistema, el polipropileno; este material es menos denso que el medio líquido por lo que flotaba con todo y explante en las primeras pruebas piloto antes de arrancar los experimentos, para solucionar esta situación se colocó un material más pesado para evitar que flote, este material fue una pieza de vidrio de 2x2 cm aproximadamente.

Para las conexiones se utilizaron dos ubicados en cada tapa de plástico de cada tanque, los conectores eran de tipo pasamuros, el material de estos es de latón con un recubrimiento de Níquel grado alimenticio (Figura 3), el cual evita la corrosión, es inerte al sistema y es resistente a la esterilización por autoclave. Se seleccionó que la conexión fuera tipo pasamuros debido a su diseño que no permitía tener una conexión en el interior y exterior del tanque, que son necesarias para el intercambio de los fluidos entre tanques y bombas; Para el armado de las conexiones en la tapa primero se realizaban dos orificios con una broca de $\frac{1}{2}$ " y taladro, con estas herramientas aseguramos un orificio lo más redondo posible, este paso es crítico debido a que si no se consigue un orificio justo y redondo en un futuro encontraremos fugas y serán complicado eliminarlas, por lo que se recomienda tener cuidado al elaborar este paso. Entre cada tuerca y la pared se colocaba un o-

ring de silicón grado alimenticio para asegurar por el interior y exterior el sello hermético entre la conexión y la tapa.

Después de las conexiones están las mangueras por donde se transporta el medio líquido y el aire. Las conexiones instaladas utilizan un tipo de manguera específico, estas un diámetro externo de 6 mm y un diámetro interno de 4 mm estas medidas son constantes en todas su longitud, el material es poliuretano resistente a la corrosión y a la esterilización por autoclave; debido a su rigidez y consistencia las mangueras no se estrangulan o colapsan en las curvas o al presionarlas por accidente con otro objeto pesado, esta es una cualidad muy importante ya que al momento de introducir las al autoclave o en el montado y armado del experimento es muy común que el estrangulamiento de las mangueras se lleve a cabo, este era un problema observado con las mangueras de silicón o látex además de que se deformaban y perdían sus propiedades después de muchos ciclos de esterilizado provocando la unión con la conexión no fuese adecuada, esto nunca se observó con las mangueras nuevas de poliuretano. La longitud de las mangueras tenía que estar cortadas a la medida para aquellas que irían dentro tendrían que ser muy precisas, las exteriores podrían tener mayor margen contemplando las distancias entre cada uno de los elementos del sistema. El corte de las mangueras tiene que ser en un ángulo de 90° cuidando de que sea lo más recto posible y sin dejar bordes irregulares ya que si no es así, esto podría provocar una incorrecta unión en las conexiones y por ende fugas y contaminación.

También se realizó una mejora en la sección de la entrada de aire a los tanques. Para mover el medio líquido de un tanque a otro y viceversa se utiliza aire impulsado por una bomba de pecera, para asegurar la asepsia en el tanque se emplean filtros hidrofóbicos de 0.45 μm de Nylon (Marca: PALL) antes de su entrada, los problemas que se observaban con los antiguos biorreactores es que los conectores, mangueras y filtros no lograban una buena sujeción entre sí después de esterilizado y muchos ciclos de operación, por lo que eran propensos a fugas y por ende a contaminación. Para solucionar este problema se utilizaron los conectores rápidos

previamente mencionados con una manguera de 3 cm aproximadamente y diámetro 6 mm para unir al filtro.



Figura 3. Conector pasamuro recto.

Diseño propio escalado

Con el sistema diseñado antes solamente se podía conectar un par de tanques (explante y medio líquido), un par de bombas (llenado y vaciado) y un par de temporizadores para controlar el encendido y apagado de las bombas, por cada ocasión se arrancaban tres biorreactores a la vez, todo esto ocupaba mucho espacio en el cuarto de incubación, además de ser complicado su transportación y montaje. Debido a esto decidí aumentar el número de biorreactores que se pudieran operar con la menor cantidad de bombas y temporizadores, reduciendo costos de operación de consumo energético y de equipo como bombas (Figura 4). Rediseñar el sistema conllevó resolver difíciles problemas hidráulicos y neumáticos. El problema se basaba en que, al ingresar aire al sistema este se presurizaba al no tener un exhausto o venteo, esto provocaba que el medio líquido no se trasladaba de un lado a otro. Dicha situación se solucionó agregando una válvula solenoide de 3 vías como se muestra en la Figura 5, esta válvula tenía que estar ubicada entre la bomba y el filtro antes de entrar al biorreactor; el temporizador, bomba y válvula solenoide se fijaron ordenadamente sobre una base de madera. Con esta modificación en el diseño se pudo operar tres biorreactores al mismo tiempo con solamente dos bombas y un par de temporizadores.



Figura 4. Diseño propio escalado de biorreactores de inmersión temporal.

Tres biorreactores (centro) operados solamente por dos bombas, dos temporizadores y dos válvulas solenoides (izquierda y derecha) montados sobre bases de madera, así se redujo la cantidad de equipo empleado y consumo de energía. El sistema es más fácil de operar que los biorreactores convencionales.

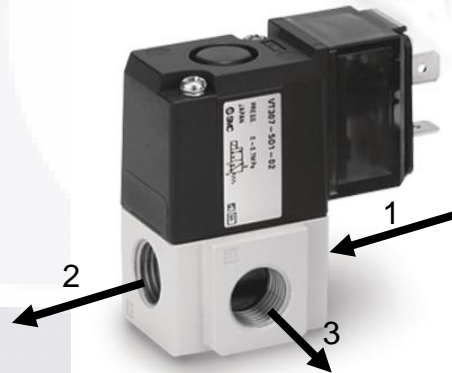


Figura 5. Válvula solenoide.

La primera posición es cuando se encuentra desactivada (sin energía) el vástago se baja y cierra la comunicación con el puerto 1 y 2, dejando conectados solamente el puerto 2 con el puerto 3, esto nos permite liberar la presión que se forma cuando el sistema se presuriza con el otro par de bomba y válvula. La segunda posición es cuando se encuentra activada (con energía) junto con la bomba, el vástago se sube

por acción de la bobina dejando conectados los puertos 1 y 2, y cerrando el puerto 2 y 3.

Diseño comercial

También se trabajó en algunos experimentos utilizando unos biorreactores comerciales adquiridos a través de una empresa de biorreactores de inmersión temporal (Marca Tecniproductos Orizaba S.A. de C.V.). El diseño contenía tres biorreactores de 1 L, dos válvulas solenoides, una bomba de pecera, un foco como fuente de iluminación y un controlador en donde se podía modificar las variables de fotoperiodo, tiempo de inmersión y frecuencia de inmersiones, todo esto instalado sobre una base de madera (Figura 6). Los conectores en las tapas eran de tipo espiga y las mangueras eran de silicón semi transparente y muy flexibles, las mangueras se sujetaban a los conectores mediante pinzas metálicas que la abrazaban y oprimían contra el conector, esto suponía más manipulación al momento del armado, que podría convertirse en contaminación.



Figura 6. Diseño comercial biorreactores de inmersión temporal.

El sistema comprende de 3 biorreactores, una bomba (azul), 2 válvulas solenoides (negras), fuente de iluminación (centro) y un controlador (caja blanca) en donde se puede manipular el fotoperiodo, tiempo de inmersión y frecuencia de inmersiones; todo el sistema está soportado en una base blanca de madera.

Armado

Antes de montar un experimento se realizaban pruebas con todo el sistema previamente limpio con el objetivo de corroborar que las conexiones, empaques, mangueras, filtros, bombas y temporizadores funcionen bien, esto se realizaba fuera de la campana y con agua corriente.

Primero se armaban las tapas con sus respectivas conexiones, empaques y tuercas, procurando que la conexión tuviera la misma porción por dentro y fuera del tanque; las tuercas se ajustaban firmemente con una llave perica procurando que no apretar demasiado para que los empaques no se deformaran y rompieran el sello hermético

provocando futuras fugas y contaminación. Después se conectaban las mangueras de acuerdo con el largo y función dentro del sistema, así como los filtros para el aire y las bombas de peceras. Enseguida se colocaba el soporte de los explantes, así como la pieza de vidrio sobre este. Se continuaba agregando agua corriente al tanque que serviría para contener el medio líquido, Se ponía a trabajar todo el sistema con el objetivo de poder solucionar los problemas observados en estas pruebas, se confirmaba que el medio líquido podía llenarse y vaciarse sin problemas y contratiempos. Una vez comprobado correcto funcionamiento del sistema se procedía a rotular e identificar las conexiones, mangueras y tanques a los que correspondían.

Para el proceso de esterilización se colocaban las mangueras desconectadas y en su tanque correspondiente para facilitar su armado dentro de la campana de flujo laminar, la parte externa de los conectores se cubrían con tres capas de papel aluminio. El tanque correspondiente al medio líquido se esterilizaba con el mismo. Las piezas pequeñas de mangueras y los filtros se esterilizaban en un frasco pequeño por separado para evitar que les entre agua.

Una vez terminado el ciclo de esterilizado y dejados enfriar se continuaba con el armado y sembrado en campana. Para conectar las mangueras y filtros en su lugar se utilizaron pinzas quirúrgicas de hemostasia esterilizadas en el esterilizador de perlas de vidrio. Se sembraban los explantes sobre el soporte del tanque destinado para los explantes. Se sellaban las tapas y conexiones con Parafilm. Dentro de la misma campana antes de sacarlos se realizaba una prueba con una bomba de pecera para comprobar que el sistema funcionaba correctamente.

Biorreactor inmersión temporal tipo RITA

Los Recipientes Automatizados de Inmersión Temporal (RITA) son otro tipo de biorreactores comerciales empleados para cultivos vegetales. Debido al número reducido de biorreactores RITAs no se pudo realizar duplicado para cada condición

de inmersión y especie, por lo que fue un experimento único. Los biorreactores se encontraban previamente ensamblados, por lo que fue sencillo observar como estaban colocadas cada una de sus piezas, para después de lavarlos volverlos a armar. Al igual que los BIT se realizaron pruebas de funcionamiento y fugas. Para sustituir la válvula solenoide que el diagrama original sugiere para su funcionamiento (Figura 1), se colocó un conector en “T” ligeramente abierta para liberar la presión de la bomba después de concluido el tiempo de inmersión para que el líquido bajara a su compartimiento.

Multiplicación en biorreactor de inmersión temporal

Partiendo del material vegetal obtenido de la etapa anterior de micropropagación de las especies en medio semisólido se seleccionaron tres especies las cuales fueron las más productivas en cuestión de brotes por explante. Dichas especies fueron *Yucca elata*, *Yucca periculosa* y *Yucca coahuilense*.

El experimento de micropropagación en biorreactor de inmersión temporal se inició de los tejidos obtenidos en medios semisólidos. Se disecó el explante obteniendo el meristemo basal del tejido, obteniendo un tejido de aproximadamente 3 cm de largo. Se colocaron dos explantes con estas características en cada frasco por biorreactor, el medio de cultivo con el que se estableció fue 150 mL de medio MS líquido con el regulador de crecimiento vegetal determinado en experimentos anteriores para cada especie. Las condiciones de crecimiento fueron a temperaturas del cuarto de incubación de 24°C, fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. Los parámetros de operación con los que se trabajaron los biorreactores fueron de una inmersión de un minuto cada 12 horas (BIT12), una inmersión de un minuto cada 24 horas (BIT24) y una inmersión de un minuto cada 36 horas (BIT36), durante 30 días.

Etapa de enraizamiento de explantes provenientes de biorreactor de inmersión temporal

Una vez cumplido el tiempo de multiplicación en los biorreactores los explantes fueron separados en brotes individuales en condiciones de asepsia en campana de flujo laminar, se contaron los brotes obtenidos a partir de los dos explantes cultivados inicialmente de cada experimento, se midieron su longitud de crecimiento y observó su apariencia en general.

Después los brotes obtenidos separados se sembraron en frascos de un litro con medio MS semisólido sin reguladores de crecimiento vegetal. Se incubaron durante 30 días en el cuarto de incubación a temperatura constante de 24°C con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. En este proceso se va a evaluar la capacidad que tienen los nuevos brotes para poder generar raíz, midiéndolas y cuantificándolas para después pasarlos a suelo.

Debido a que los explantes se vitrificaban después de haber sido subcultivados en medio semisólido para su enraizamiento se optó por otra alternativa para mejorar la adaptación al suelo de los explantes la cual fue colocar los explantes después de la propagación en BIT directamente en solución con 0.5 mg*L⁻¹ de IBA durante 24h, al día siguiente se pasaban a maceta para comenzar su proceso de adaptación.

Etapa de enraizamiento de explantes provenientes del sistema semisólido

Para poder comparar ambos sistemas hasta el proceso de enraizamiento también se realizaron las mismas pruebas para observar si había diferencias entre cada sistema. De igual forma los brotes obtenidos del sistema semisólido se separaron y sembraron en frascos de un litro con medio MS sin regulador de crecimiento vegetal durante un lapso de 30 días

Etapa de aclimatación

En este proceso solamente se sembraron aquellos que hayan generado raíz en la etapa de enraizamiento. Se colocaron las plántulas en bolsas polietileno para vivero

de 30 x 20 cm, como sustrato se utilizó peat moss, el riego se realizó dos veces por semana cuidando mantener siempre húmedo el sustrato, durante las primeras dos semanas de adaptación a suelo las plantas se cubrieron con bolsas para conservar la humedad dentro de la bolsa. El proceso de aclimatación se realizó en condiciones de invernadero.

Optimización de multiplicación en biorreactor de inmersión temporal

Después de haber obtenido los resultados de la etapa de multiplicación de las tres especies en biorreactores de inmersión temporal con un minuto de inmersión cada 12, 24 y 36 h. La mejor condición de multiplicación para las tres especies fue la inmersión de un minuto cada 12 horas por lo que se decidió partir de esta condición. Decidimos aumentar el tiempo de inmersión con la misma frecuencia de inmersión. Ahora los tres nuevos tiempos de inmersión serían 1, 3 y 9 minutos cada 12 horas. Las demás condiciones como fotoperiodo, medio líquido, y reguladores de crecimiento permanecieron constantes como en los experimentos anteriores. Los experimentos se realizaron por duplicado.

RESULTADOS

Multiplicación en sistema semisólido

Después de haber evaluado las seis especies de *Yucca carnerosana*, *Yucca filamentosa*, *Yucca filifera*, *Yucca periculosa*, *Yucca elata* y *Yucca coahuilense*. Los resultados obtenidos de este experimento se pueden observar en la figura 7. Con este experimento logramos saber cuáles de las seis especies de *Yucca* son las que mayor número de brotes por explante producen. Las que mayor productividad generaron fueron *Y. elata*, *Y. coahuilense* y *Y. periculosa* con 4.7, 3.8 y 3.0 brotes por explante respectivamente, las otras tres especies que menor productividad generaron fueron *Y. filifera*, *Y. carnerosana* y *Y. filamentosa* con 1.0, 1.4 y 2.0 brotes por explante.

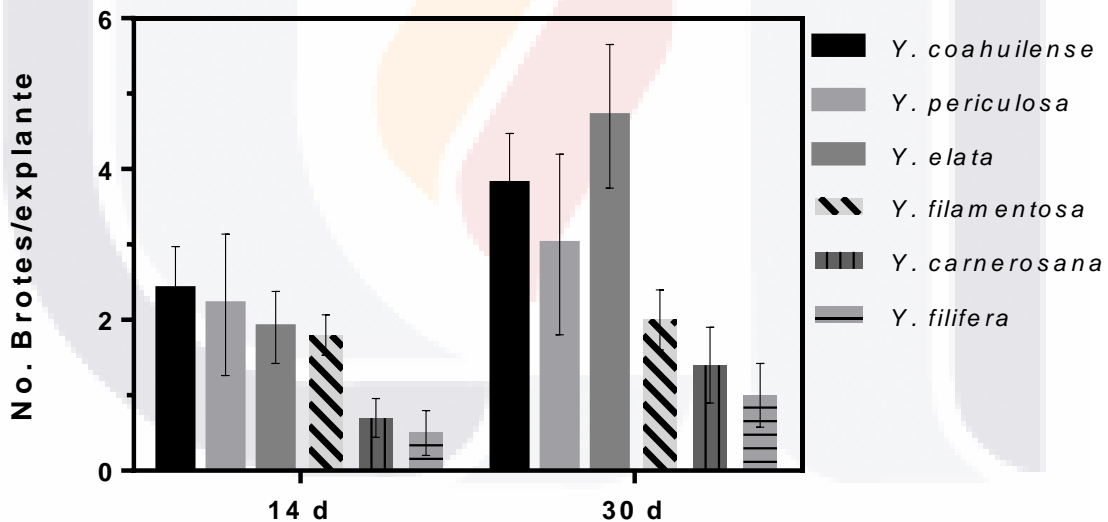


Figura 7. Multiplicación de brotes por explante en medio MS semisólido.

Observaciones a 14 días y 33 días de cultivo para las especies *Yucca carnerosana*, *Yucca filamentosa*, *Yucca filifera*, *Yucca periculosa*, *Yucca elata* y *Yucca coahuilense*, n=13.

Con base en estos resultados (Figura 7) se decidió seleccionar a las especies con mayor productividad de brotes por explante para poder estudiar su comportamiento en los sistemas de inmersión temporal y de esta forma aumentar la productividad.

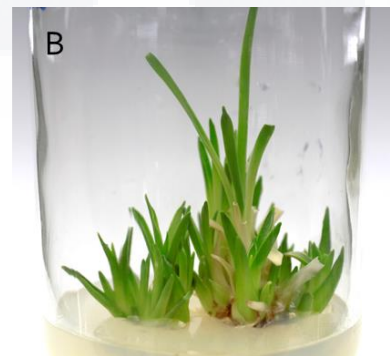
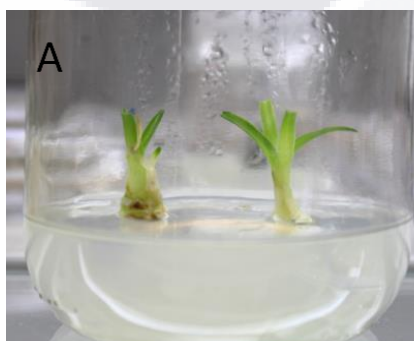
Micropropagación en BITs

Yucca elata

Multiplicación en biorreactor de inmersión temporal Yucca elata

Se comenzó estudiando esta especie debido a que fue la que mejores resultados de generación de brotes nuevos obtuvo comparado con las otras cinco especies de *Yucca*. Observando los resultados de la figura 8 tenemos los tejidos al inicio y al final del experimento. Podemos observar que en el BIT 12 obtuvimos mayor producción de 10.5 brotes por explante comparado con el sistema semisólido con 4.7 brotes por explante, así mismo como en la longitud del brote, por lo que el BIT12 resultó tener mayor productividad con un aumento del 223%.

Así mismo en la figura 9 tenemos la relación de productividad de *Yucca elata* en los biorreactores de inmersión temporal (BIT12, 24 Y 36). El tratamiento que mayor productividad obtuvo fue BIT 12 con 10.5 brotes por explante, seguido de BIT 36 con 6.5 brotes por explante y por último BIT 24 con 4.5 brotes por explante. Los explantes obtenidos con los biorreactores RITA no resultaron ser mejores que los obtenidos en los biorreactores tipo BIT.



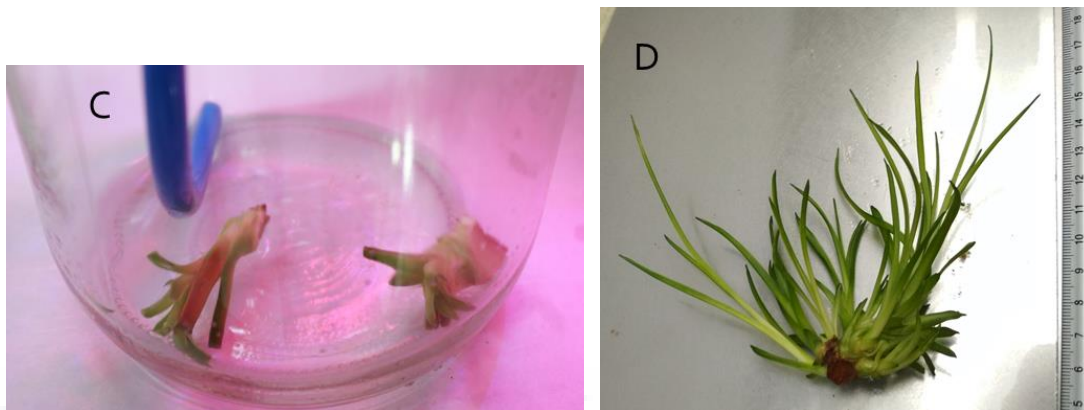


Figura 8. Progreso de producción y crecimiento de brotes de *Yucca elata* en biorreactor de inmersión temporal y semisólido.

A. sistema semisólido a 0 días, B. sistema semisólido a 30 días C. BIT 12 a 0 días, D. BIT 12 a 30 días.

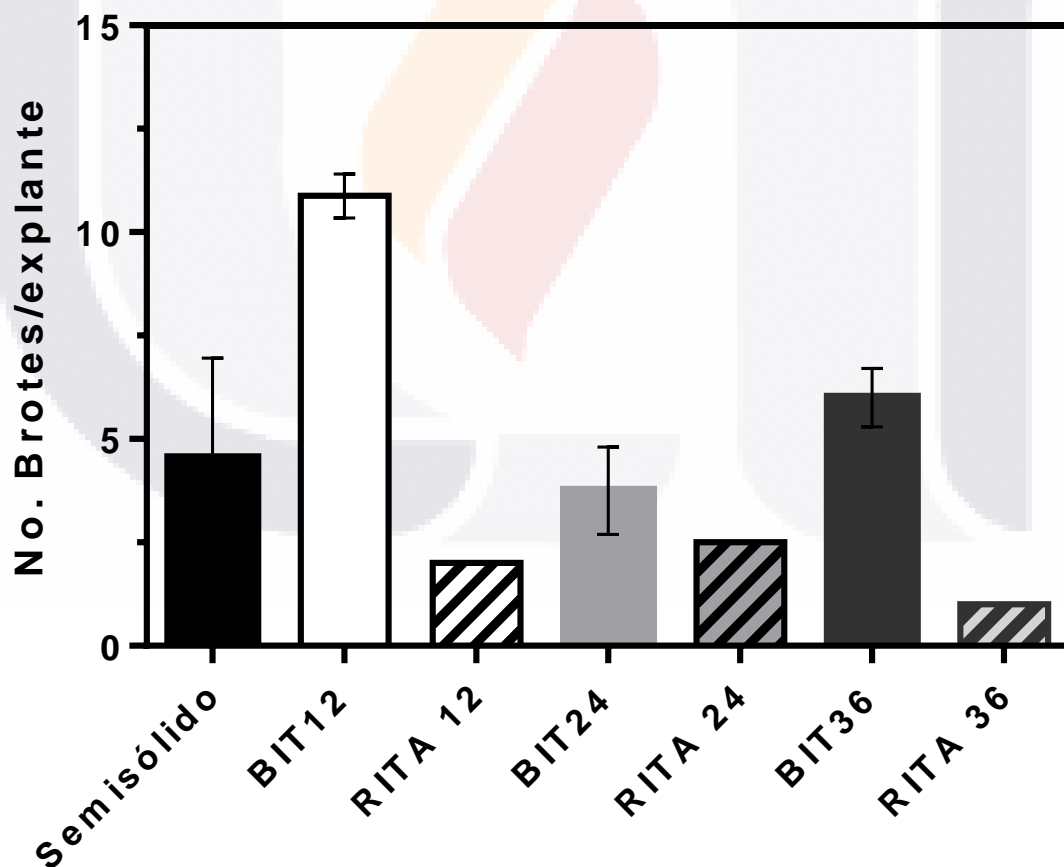


Figura 9. Producción de número de brotes de *Yucca elata* en biorreactor de inmersión temporal BIT y RITA comparado con el sistema semisólido.

En los resultados encontramos que la mayor productividad fue observada en BIT12, BITs n=2; RITAs n=1, barras desviación estándar.

Longitud de brotes de Yucca elata

Además de cuantificar el número de brotes por explantes obtenidos en cada tratamiento también se midió la longitud de cada uno de los brotes (Figura 10). Esto se realizó debido a que el tamaño del explante también va a ser fundamental para el proceso de enraizamiento y su posterior aclimatación en suelo.

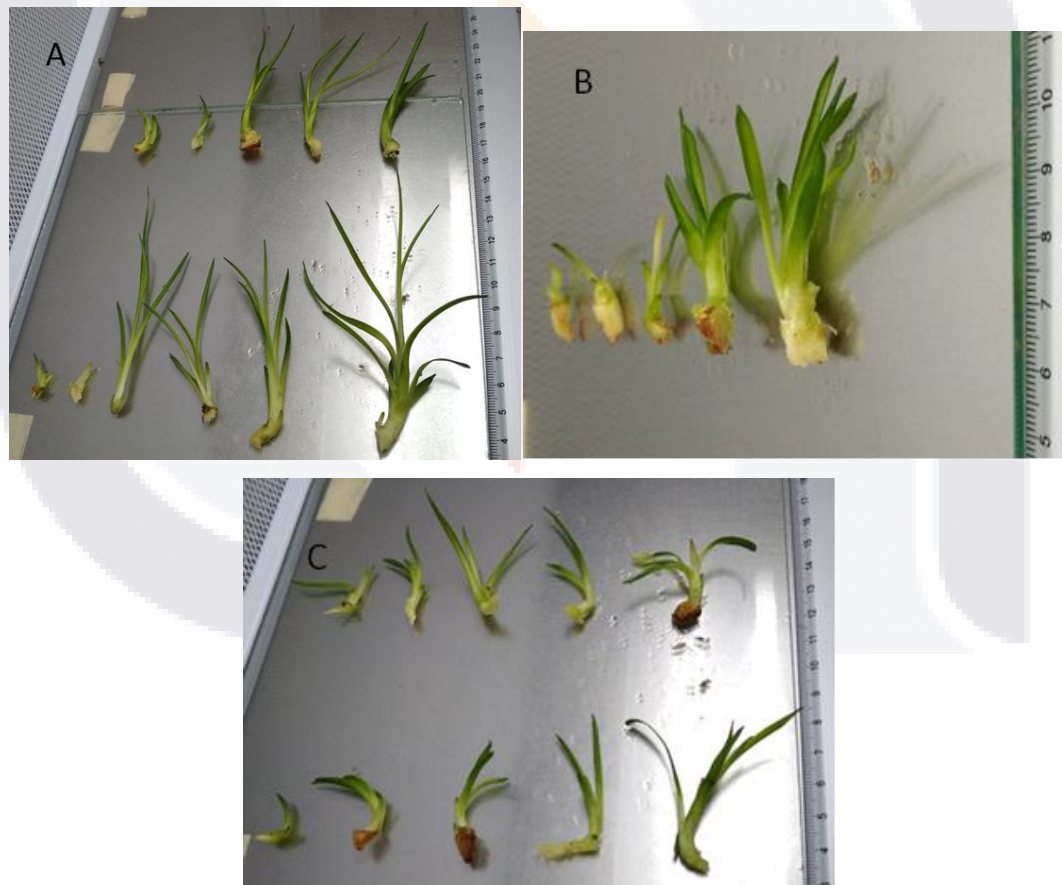


Figura 10. Longitud de los brotes de *Yucca elata* a diferentes BITs.

A BIT 12, B BIT 24, C BIT 36.

Para poder cuantificar las longitudes se dividieron en 3 clases: de 1 - 5 cm, 6 - 10 cm y 11 - 15 cm. En la figura 11 tenemos la cantidad de brotes que se encuentran en cada clase y también diferenciados por colores dependiendo del BIT al que corresponde. Se puede apreciar que la mayoría de los brotes tienen una longitud 1 - 5 cm mientras que los brotes de mayor tamaño de 11 – 15 cm son minoría, a excepción del tratamiento de BIT12 que tiene 11 brotes con un tamaño de 6 – 10 cm.

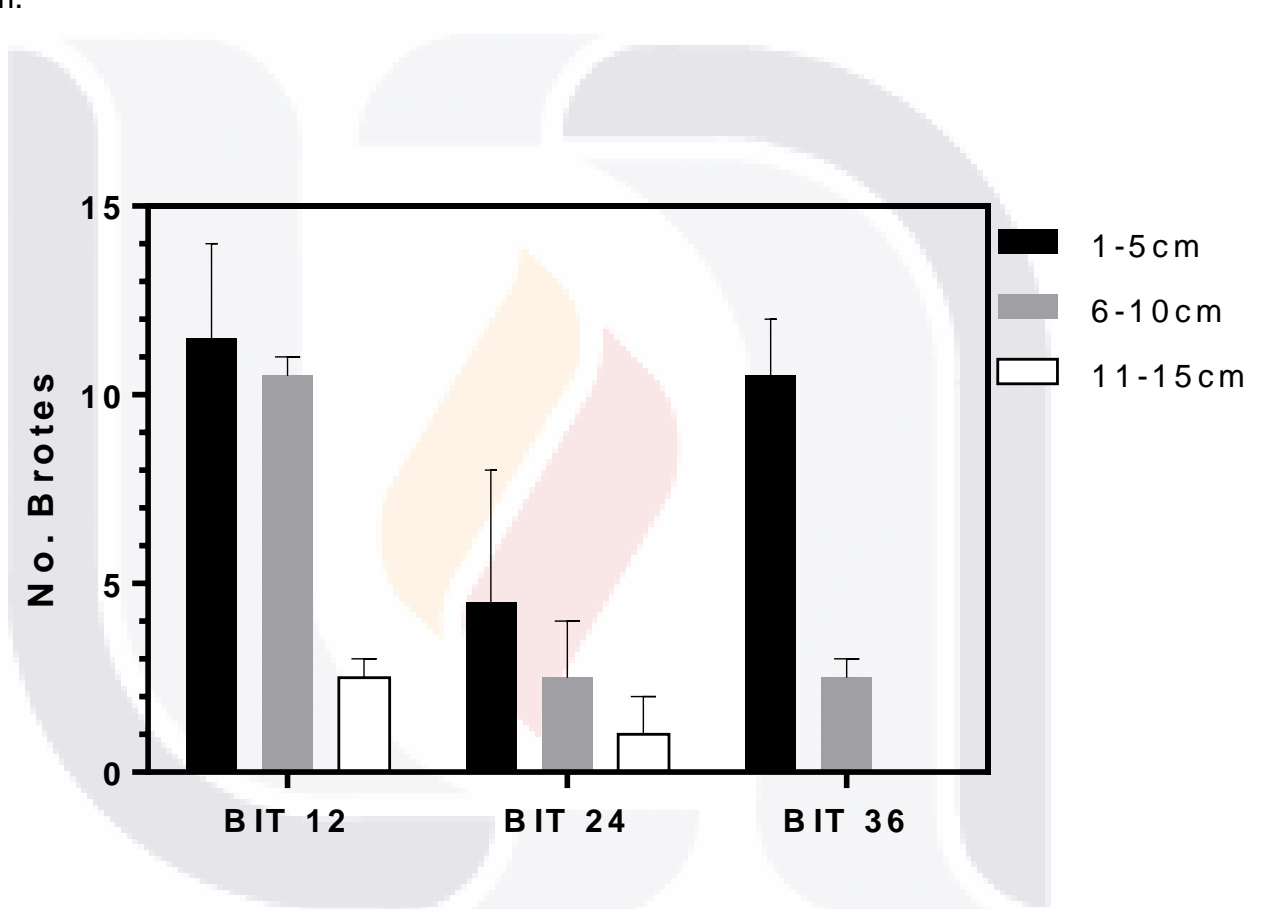


Figura 11. Longitud y cantidad de brotes de *Yucca elata* producidos en BIT con diferentes tiempos de inmersión.

La mayor cantidad de brotes obtenidos de mayor talla de 11-15cm fue en BIT 12, así como de 6-10cm y 1-5cm. Las barras son de desviación estándar.

Etapas de enraizamiento de Yucca elata

Los resultados obtenidos del proceso de enraizamiento de *Yucca elata* en biorreactores de inmersión temporal y sistema semisólido se pueden apreciar en la tabla 1, donde tenemos que los brotes provenientes del sistema semisólido tienen mayor capacidad de enraizamiento y producen más raíces por explante en comparación con los BITs. La cantidad y longitud de la raíz también es un factor clave para que los brotes se puedan aclimatar bien. De igual forma podemos apreciar en la figura 12 como las raíces en los tratamientos con BIT no son muy largas y abundantes, en el caso de BIT ningún brote presentó raíz.

Tabla 1. Número de raíces y porcentaje de enraizamiento para *Yucca elata* en biorreactores de inmersión temporal y sistema semisólido.

| Tratamiento | No. Raíces/ explante | Porcentaje enraizamiento (%) |
|-------------|----------------------|------------------------------|
| Semisólido | 6.33 | 100% |
| BIT 12 | 0.52 | 19% |
| BIT 24 | 0.00 | 0% |
| BIT 36 | 0.69 | 15% |



Figura 12. Proceso de enraizamiento de *Yucca elata* en biorreactores de inmersión temporal en medio semisólido.

A) BIT12, fue los brotes que obtuvieron mayor cantidad de raíces B) BIT24 C) BIT36.

Etapas de aclimatación de Yucca elata

Para el proceso de aclimatación en suelo con condiciones de invernadero para *Yucca elata* se puede resumir en la tabla 2, donde tenemos que todas las plantas que se pasaron a suelo provenientes del sistema semisólido y BIT12 alcanzaron el

100% de supervivencia, mientras que 50% fue para BIT 36 y el 0% para BIT24. Los altos y bajos porcentajes de supervivencia están correlacionados con la longitud y número de raíces, así como del tamaño del tejido.

En la figura 13 se presentan las fotografías representativas de ambos sistemas semisólido y BIT. En donde de forma cualitativa se puede decir que tienen las mismas características.

Tabla 2. Porcentaje de supervivencia al proceso de aclimatación de *Yucca elata*

| Tratamiento | Porcentaje supervivencia |
|-------------|--------------------------|
| Semisólido | 100% |
| BIT 12 | 100% |
| BIT 24 | 0% |
| BIT 36 | 50% |

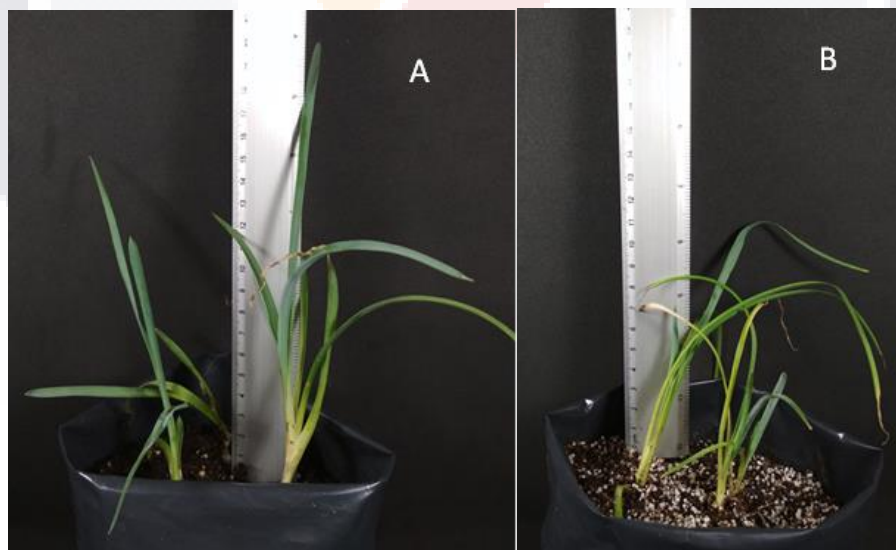


Figura 13. Proceso de aclimatación de *Yucca elata* en peat moss.

A) BIT 12; B) Semisólido. Ambas plantas se observan en buenas condiciones después de 30 días de adaptación en invernadero.

Yucca coahuilense

Esta especie resultó ser la segunda con mayor productividad de brotes por explantes en el experimento de propagación realizado en medio semisólido, por lo que fue el segundo en ser evaluado a través del sistema con biorreactores de inmersión temporal.

Multiplicación en biorreactor de inmersión temporal de Yucca coahuilense

Al momento de micropropagar la especie de *Y. coahuilense* en medio semisólido encontramos que los explantes respondieron bien a la citocina ya que los brotes obtenidos se encontraban en buenas condiciones de crecimiento, no estaban etiolados, vitrificados o con tejido calloso (Figura 14). En el caso de los brotes generados en los sistemas de biorreactores de inmersión temporal también resultaron tener una buena respuesta al sistema



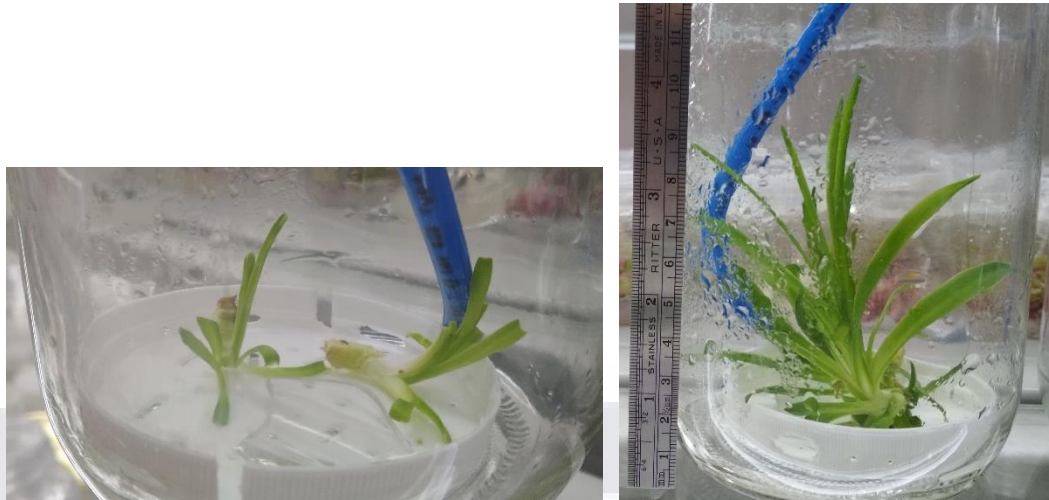


Figura 14. Progreso de producción y crecimiento de brotes de *Yucca coahuilense* en biorreactor de inmersión temporal y semisólido.

En parte superior explantes en medio semisólido al inicio y final del experimento. En la parte inferior explantes al inicio y final del experimento en BIT.

En esta especie pudimos observar que los explantes tenían complicaciones para adaptarse a los sistemas de inmersión temporal RITA y BIT ya que como podemos observar en la Figura 15 que en los experimentos de RITA12, BIT24 y RITA 36 no se produjo ningún brote nuevo. El tratamiento que tuvo mejor resultado fue RITA24 con 6 brotes/explante, después BIT12 con 4.5 brotes/explante superando al control (semisólido) 3.6 brotes/explante y por último BIT36 con 1.5 brotes/explante. En *Y. coahuilense* encontramos que es la única especie de las tres que es mejor micro propagándose en RITA que en BIT

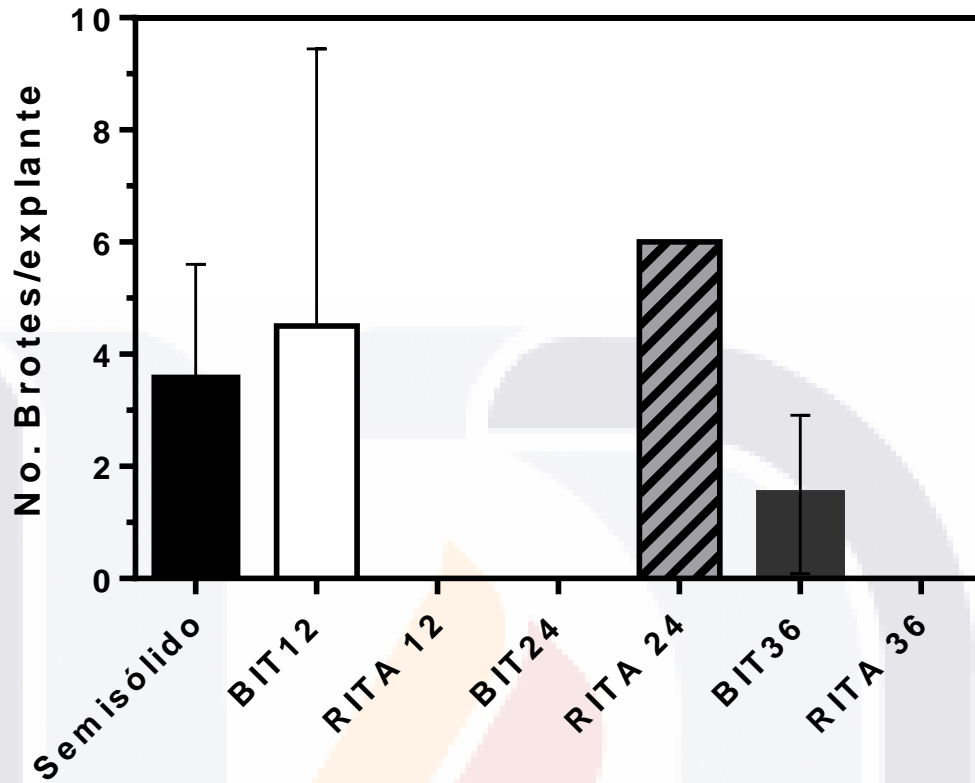


Figura 15 Producción de número de brotes de *Yucca coahuilense* en biorreactor de inmersión temporal BIT y RITA comparado con el sistema semisólido.

Los BITs en *Y. coahuilense* no resultó ser mejor tratamiento que el control en medio semisólido, solo BIT12 igualó la productividad a Semisólido con 4.5 brotes/explante. RITA24 es el mejor tratamiento. BITs n=2; RITAs n=1, barras desviación estándar.

Longitud de brotes de Yucca coahuilense

Los brotes obtenidos a través de los BITs y RITAs son explantes con un buen desarrollo de tamaño y estructura que se pueden observar en la Figura 16. Estos brotes tienen sus hojas y microtallos bien desarrollados, no tienen raíz, no se

encuentran etiolados y no generaron tejido calloso, estas condiciones van a ser propicias para que la posibilidad de que el explante se adapte a suelo sean mayores.

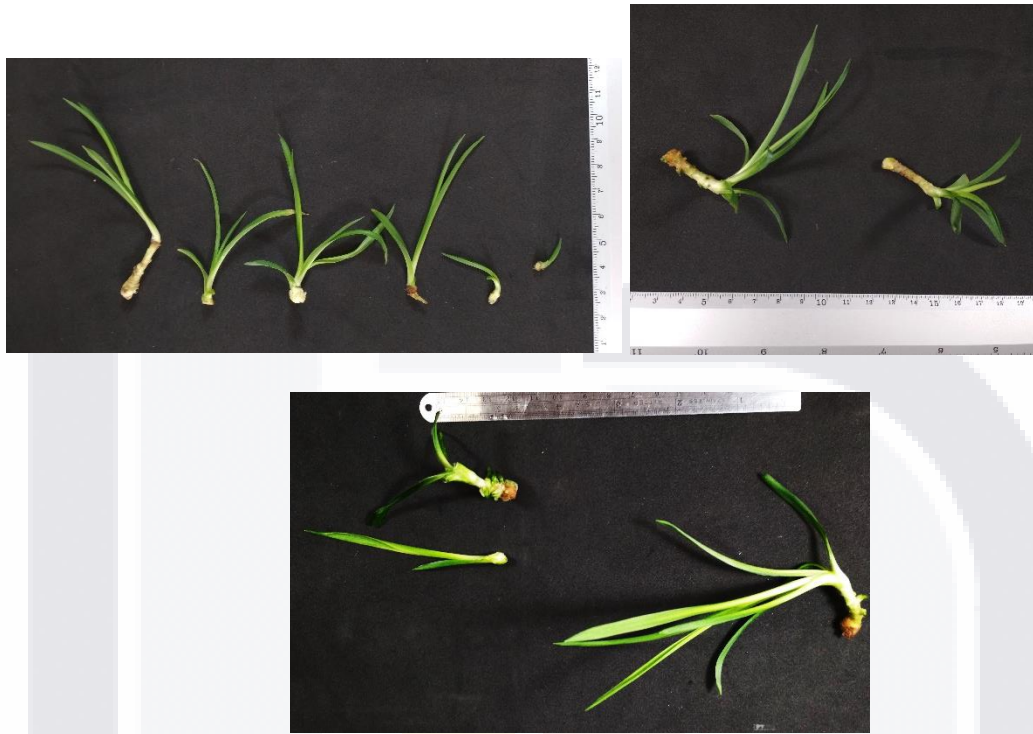


Figura 16. Longitud de los brotes de *Yucca coahuilense* a diferentes BITs.

Parte superior izquierda, explantes obtenidos de BIT12; Superior derecha, explantes obtenidos de BIT 24; Inferior, explantes obtenidos de BIT36. Los explantes obtenidos en BIT 24 no generaron brotes nuevos por lo que solamente se dedicaron a crecer en su talla. BIT12 y BIT 36 si produjeron brotes en buenas condiciones.

La longitud de los brotes obtenidos en *Y. coahuilense* también fue contabilizada para tener registro de cuales condiciones se producían las mayores longitudes de explante nuevos (Figura 17). Con esta especie pudimos observar que fue la única que generó explantes de un tamaño de entre 16 a 20 cm observados en BIT12 y BIT 24. Que los explantes tengan una talla mayor a 5cm propicia que el proceso de adaptación a suelo se realice mejor, ya que los menores a 5cm no alcanzaban a adaptarse y el tejido se moría.

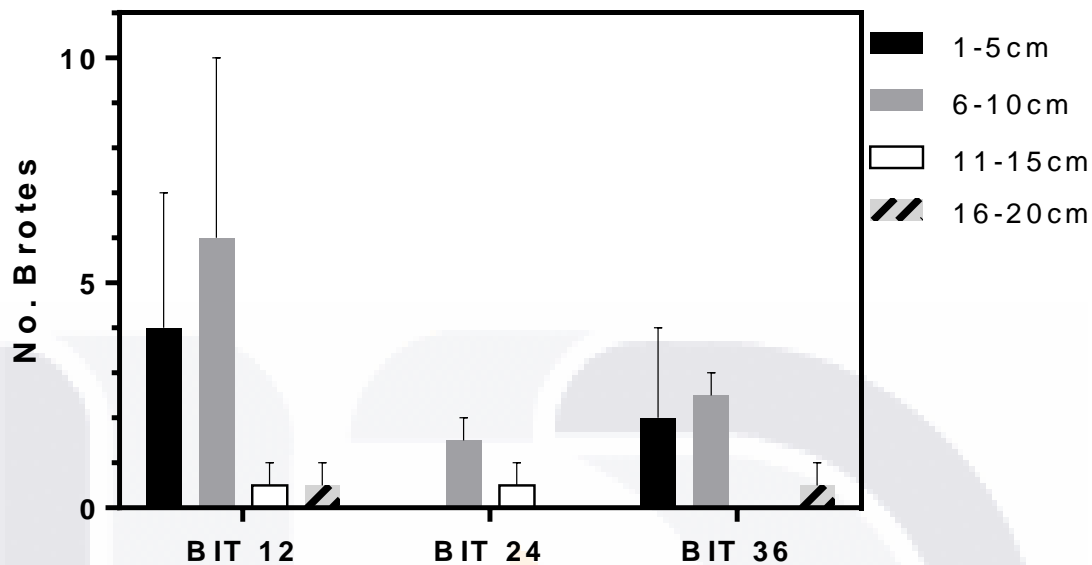


Figura 17. Longitud y cantidad de brotes de *Yucca coahuilense* producidos en BIT con diferentes tiempos de inmersión.

En los tres tratamientos predominan los brotes de 1-5cm y 6-10cm. En esta ocasión se observó por primera vez explantes de 16-20cm. Barras de desviación estándar

Etapa de enraizamiento de Yucca coahuilense

El proceso de enraizamiento en medio semisólido MS sin reguladores de crecimiento vegetal provocó en *Y. coahuilense* tejido calloso en algunos brotes. En esta especie si se logró obtener una mejor respuesta al proceso de enraizamiento. Las raíces encontradas estaban bien diferenciadas con una longitud promedio de 5-10 cm, en algunas raíces se observaban raíces secundarias delgadas y frágiles que al momento de retirarlas del medio podían romperse (Figura 18). Los brotes más pequeños menores al rango de 5cm son los que presentaban vitrificación, estos no sobrevivían al proceso de adaptación en suelo.



Figura 18. Proceso de enraizamiento de *Yucca coahuilense* en biorreactores de inmersión temporal en medio semisólido.

Superior izquierda, BIT 12; Superior derecha, BIT 24; Inferior, BIT 36

En el experimento de los brotes provenientes de un sistema de medio semisólido el número de raíces por explantes producidas fue de 3.25, obteniendo un 100% de enraizamiento, todos los brotes produjeron raíces. Con BIT 12 y BIT 24 solamente se produjo 1 raíz/explante en ambos casos, el 33% y 100% de enraizamiento respectivamente. En BIT 36 se generó 1.5 raíces/explante siendo la condición con más número de raíces por explante producidas de los BITs en *Y. coahuilense*; y con un porcentaje de enraizamiento del 29%. La condición con mayor porcentaje de enraizamiento fue BIT 24 seguido de BIT 12 y por último BIT 36 observado en Tabla 3.

Tabla 3. Número de raíces y porcentaje de enraizamiento para *Yucca coahuilense* en biorreactores de inmersión temporal y sistema semisólido.

| Tratamiento | No. Raíces/ explante | Porcentaje enraizamiento (%) |
|-------------|----------------------|------------------------------|
| Semisólido | 3.25 | 100% |
| BIT 12 | 1 | 33% |
| BIT 24 | 1 | 100% |
| BIT 36 | 1.5 | 29% |

Etapas de aclimatación de Yucca coahuilense

En el proceso de aclimatación a suelo en condiciones de invernadero encontramos que los brotes provenientes de un sistema de medio semisólido el porcentaje de supervivencia fue del 100% (Tabla 4) puede ser debido al porcentaje de enraizamiento obtenido en la etapa anterior. En BIT 12 la supervivencia fue del 72%

Tabla 4 Porcentaje de supervivencia al proceso de aclimatación de *Yucca coahuilense*

| Tratamiento | Porcentaje supervivencia |
|-------------|--------------------------|
| Semisólido | 100% |
| BIT 12 | 72% |
| BIT 24 | 100% |
| BIT 36 | 67% |

Yucca periculosa

La especie de *Yucca periculosa* fue la última que se estudió porque fue la que menor cantidad de brotes por explantes produjo en el sistema de medio semisólido. Los explantes obtenidos en medio semisólido crecieron con un aspecto sano, no presentaron tejido caloso, ni vitrificación, ni explantes etiolados. Las hojas de los explantes crecidos en BITs se desarrollaban ligeramente enrolladas hacia adentro y por todo el largo de la hoja y la punta también se curvaba un poco hacia afuera, la ligera modificación encontrada no afectó en el desarrollo de la planta durante la experimentación, esta alteración de las hojas nunca se llegó a observar en los explantes obtenidos en el sistema de medio semisólido (Figura 19 y 21).

Multiplicación en biorreactor de inmersión temporal de Yucca periculosa

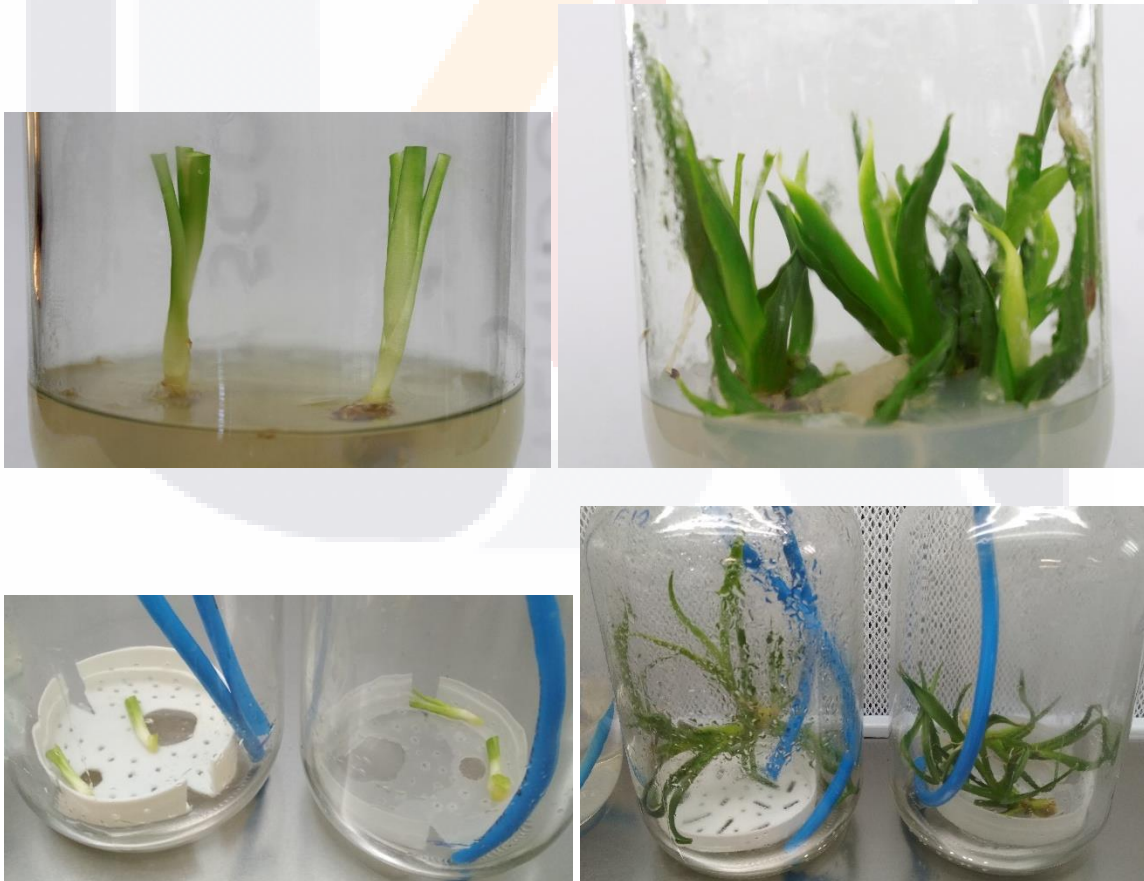


Figura 19. Progreso de producción y crecimiento de brotes de *Yucca periculosa* en biorreactor de inmersión temporal y semisólido.

Superior, sistema medio semisólido a 0 y 30 días; Inferior, sistema de biorreactores de inmersión temporal BIT a 0 y 30 días.

En cuanto a la productividad de brotes por explantes tenemos en la Figura 20 que el mejor tratamiento para *Y. periculosa* en BITs fue BIT 12 con 3 brotes/explante igualando con la misma cantidad de brotes al control, el sistema en medio semisólido, después tenemos a BIT 24 con 1.75 brotes/explante y por último BIT 36 con 0.5 brotes/explante, estos dos últimos tienen menor productividad comparado con un sistema de medio semisólido, por lo que no es recomendable utilizar BITs con estas dos condiciones para micropropagar esta especie en grandes cantidades.

La mejor respuesta obtenida de productividad de brotes en los biorreactores RITA se observó en la condición de RITA 24 con 2 brotes/explante seguido de RITA 12 con 1 brote/explante y por último RITA 36 que no produjo ningún brote nuevo solamente se mantuvieron los explantes principales y crecieron, el desempeño de estos 3 experimentos no fue mejor que el control en sistema de medio semisólido, por lo que no es recomendable utilizar este diseño de biorreactores para la micropropagación en masa de *Y. periculosa*.

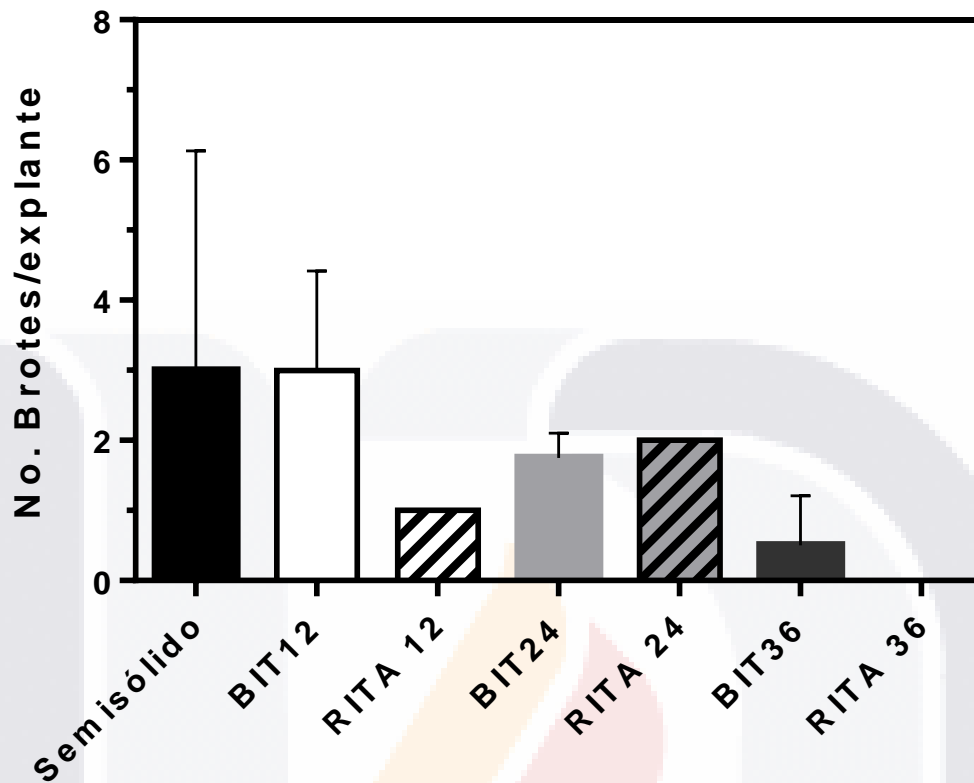


Figura 20. Producción de número de brotes de *Yucca periculosa* en biorreactor de inmersión temporal BIT y RITA comparado con el sistema semisólido.

El mejor tratamiento con BITs es BIT 12 pero no resulta mucho mejor que el control, el mejor resultado obtenido con RITAs es con RITA 24 que se encuentra por debajo del control. BITs n=2; RITAs n=1, barras desviación estándar.

Longitud de brotes de Yucca periculosa

La longitud de cada uno de los brotes de *Y. periculosa* provenientes de los experimentos de sistemas de BITs fue medida, para catalogar las tallas de los explantes en cada uno de los sistemas (Figura 21). En los explantes obtenidos de BIT 12 y BIT 24 encontramos que sus hojas se encuentran enrolladas u onduladas como previamente lo describimos, fuera de eso se ven bien, no tienen tejido calloso

ni se encuentran vitrificados o etiolados; los explantes en donde no se observó esta alteración fue en los obtenidos con BIT 36. Esto es bueno debido que es necesario que estén sanos para que en la siguiente etapa de aclimatación a suelo su probabilidad de supervivencia sean mayores.



Figura 21. Longitud de los brotes de *Yucca periculosa* a diferentes BITs.

Superior izquierda, BIT 12; Superior derecha, BIT 24; Inferior, BIT 36. En las tres condiciones tenemos explantes bien desarrollados cada uno de estos con su meristemo basal con buena proporción que podría favorecer el proceso de enraizamiento y adaptación a suelo.

En la Figura 22 encontramos que la mayoría de los explantes producidos en BIT 12 es de un rango entre 6 y 10 cm de longitud lo que representa enseguida de los brotes de 1 – 5 cm estos siguen siendo una parte proporcional importante, para

aumentar su talla podríamos dejarlos más tiempo en el BIT para que se desarrollen más y que haya más probabilidades de supervivencia en la etapa de aclimatación en suelo. En el caso de BIT24 los tamaños de los explantes están distribuidos entre los explantes obtenidos. Con BIT 36 la mayoría de los explantes los encontramos con una medida de 6-10cm y la minoría en BIT 12 y BIT 36.

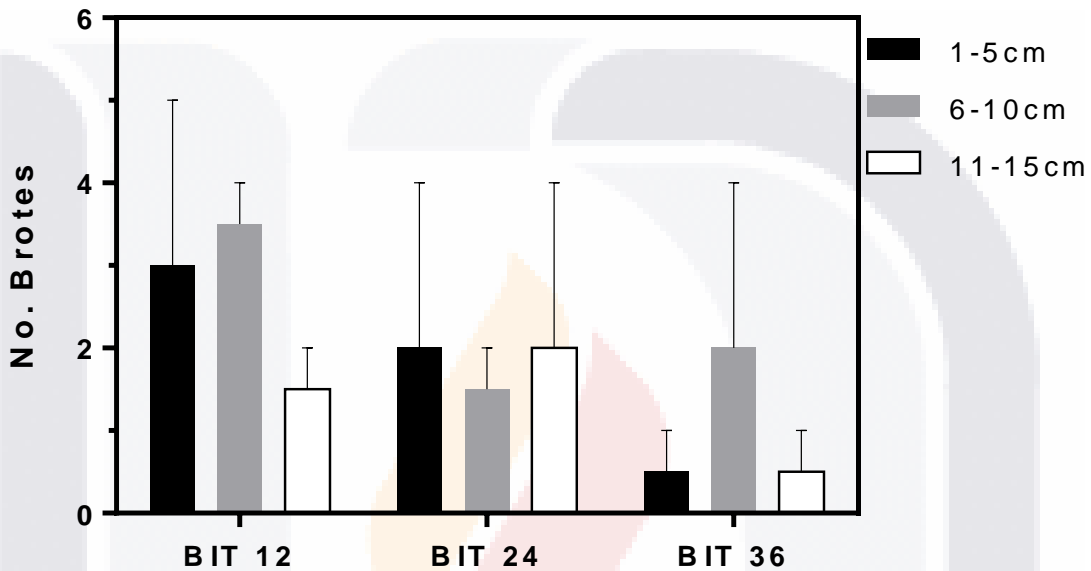


Figura 22. Longitud y cantidad de brotes de *Yucca periculosa* producidos en BIT con diferentes tiempos de inmersión.

En BIT 12 y 24 tenemos una mayoría de brotes en el rango de 1-5cm, por lo que podemos dejarlos más días dentro del biorreactor para que se desarrollen más y sea más fácil aclimatarlos a suelo.

Etapa de enraizamiento de Yucca periculosa

En el proceso de enraizamiento de *Y. periculosa* encontramos una buena respuesta en los brotes provenientes de BIT 12 como se puede observar en la Figura 23 las raíces son muy largas con una longitud promedio de 10cm, en el caso de BIT 24 no todos los brotes desarrollaron raíces al igual que en el caso de BIT 36. Cabe

mencionar que esta especie no presentó vitrificación en los brotes ya que en el proceso de enraizamiento si se vitrificaron. En este experimento podemos observar que los brotes tienen una apariencia normal, sin alteraciones morfológicas.



Figura 23. Proceso de enraizamiento de *Yucca periculosa* en biorreactores de inmersión temporal en medio semisólido.

Superior izquierda, BIT 12; Superior derecha, BIT 24; Inferior, BIT 36.

Los resultados cuantitativos se presentan en la Tabla 5 en donde tenemos que los brotes provenientes del sistema de medio semisólido produjeron 1.42 raíces/explante y un solo un 83% obtuvieron raíz. Cierta similitud se guarda con los resultados de BIT 12 ya que con este sistema se produjo 1.86 raíces/explante en un 78% de los individuos observados. Mientras que con BIT 24 y BIT 36 los resultados

son muy similares entre sí, produciendo 1 raíz/explante en ambos casos y solamente el 20% y 25% respectivamente obtuvieron raíz.

Tabla 5. Número de raíces y porcentaje de enraizamiento para *Yucca periculosa* en biorreactores de inmersión temporal y sistema semisólido.

| Tratamiento | No. Raíces/explante | Porcentaje enraizamiento (%) |
|-------------|---------------------|------------------------------|
| Semisólido | 1.42 | 83% |
| BIT 12 | 1.86 | 78% |
| BIT 24 | 1 | 20% |
| BIT 36 | 1 | 25% |

Etapas de aclimatación de Yucca periculosa

El porcentaje de supervivencia de los brotes provenientes de un sistema de medio semisólido fue del 100% teniendo en cuenta que un 17% de los individuos no generó raíz, a pesar de que tenían ciertas similitudes con BIT12 el resultado no fue el mismo con la supervivencia, ya que solamente el 10% de los individuos observados se adaptó a suelo correctamente (Tabla 6). Con BIT 24 el porcentaje de supervivencia fue 40% a pesar de su bajo porcentaje de enraizamiento lograron sobrevivir más. En BIT 36 se observó el mayor porcentaje de supervivencia de los sistemas BITs con un 70% de los individuos que se adaptaron correctamente a suelo.

Tabla 6. Porcentaje de supervivencia al proceso de aclimatación de *Yucca periculosa*

| | Porcentaje supervivencia |
|------------|--------------------------|
| Semisólido | 100% |
| BIT 12 | 10% |
| BIT 24 | 40% |
| BIT 36 | 75% |

Optimización de multiplicación en biorreactor de inmersión temporal

Después de haber experimentado con la tres diferentes condiciones 1 inmersión de 1 minuto cada 12 horas (BIT 12), 1 inmersión de 1 minuto cada 24 horas (BIT 24) y 1 inmersión de 1 minuto cada 36 horas (BIT 36) para cada una de las tres especies *Y. elata*, *Y. coahuilense* y *Y. periculosa* 10.8, 4.5 y 3.0 brotes/explante respectivamente, se determinó que la mejor condiciones de micropropagación en biorreactores de inmersión temporal fue con una inmersión de 1 minuto cada 12 horas. Se modificaron las condiciones de operación en este sistema con el propósito se aumentar la productividad de brotes en el proceso de micropropagación. Por lo que se aumentó el tiempo de la inmersión a 3 minutos y 9 minutos dentro del mismo rango de tiempo, cada 12 horas.

Yucca elata

En el proceso de optimización de la especie de *Y. elata* en las nuevas condiciones BIT 3/12 y BIT 9/12 presentadas en la Figura 24 podemos observar que con BIT3/12 se produjo 4 brotes/explante y en BIT9/12 7.5 brotes/explante, estos dos resultados no fueron mejores que su experimento predecesor BIT 12 con 10.5 brotes/explante, cabe mencionar también que los nuevos experimentos realizados la mayoría de los brotes se vitrificaron, debido a la prolongada inmersión con el medio líquido; los

brotes nuevos no presentaron tejido calloso ni etiolación. Debido a esto se considera que estas condiciones para esta especie no son viables.

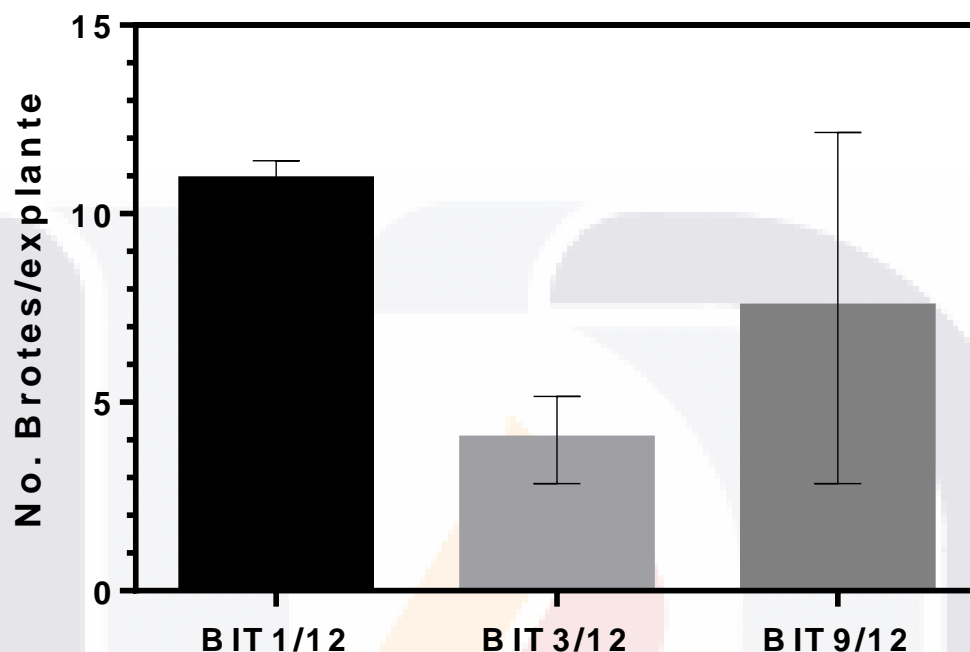


Figura 24. Proceso de optimización de *Yucca elata* a mayor tiempo de inmersión en BITs.

BIT1/12 sigue siendo la mejor condición para micropropagación de esta especie ya que la productividad en BIT3/12 y BIT9/12 es menor y los brotes obtenidos se encuentran vitrificados. Barras de desviación estándar, n=2.

Yucca coahuilense

Los resultados obtenidos en esta etapa de automatización encontramos un claro aumento en la productividad comparado con BIT12 (Figura 25). Comenzando con BIT 3/12 tenemos 12.5 brotes/explante esto es un aumento de un 329% comparado con BIT12, incluso es mucho mayor que la reportada para *Y. elata* con BIT 12 de 10.8 brotes/explante. En BIT 9/12 obtuvimos 4.25 brotes/explante este resultado es casi igual al obtenido con BIT 1/12. Los brotes obtenidos en estos dos últimos

experimentos presentaban también vitrificación por los tiempos prolongados de inmersión, por lo que esto representa una dificultad para el proceso de aclimatación a suelo, ya que el tejido no regresa a la normalidad ni se desarrolla adecuadamente.

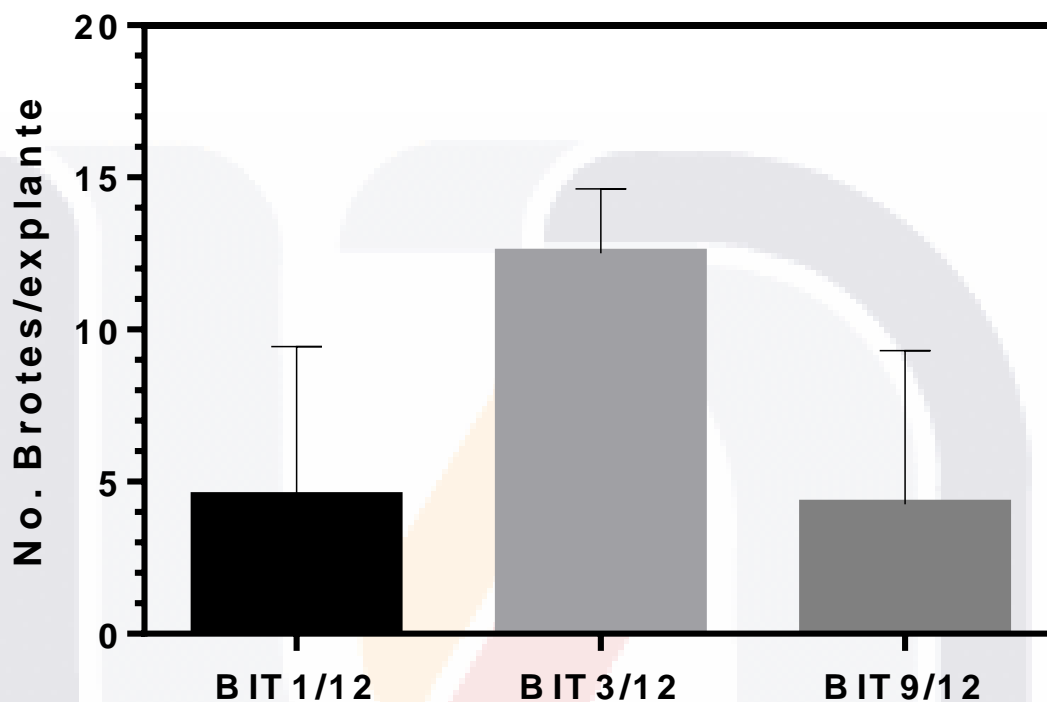


Figura 25. Proceso de optimización de *Yucca coahuilense* a mayor tiempo de inmersión en BITs.

En estos experimentos podemos encontrar la condición con mayor productividad en BIT 3/12 con 12.5 brotes/explante; BIT 1/12 y BIT 9/12 no son significativamente diferentes. Barras de desviación estándar, n=2.

Yucca periculosa

En el proceso de optimizar la productividad micropropagación en BITs encontramos que en *Y. periculosa* con la condición de BIT 3/12 se produjo 0.25 brotes/explante es la segunda condición con menor productividad después de *Y. coahuilense* BIT24 con 0 brotes/explante; Con BIT 9/12 tenemos una productividad de 3.33 brotes/

explante que comparado con BIT 1/12 3.0 brotes/explante es un poco mejor pero no es significativamente diferente. Estos nuevos experimentos optimización resultaron iguales que los anteriores realizados con las otras dos especies de *Yucca* anteriores, ya que estos brotes también presentaron una vitrificación en sus hojas.

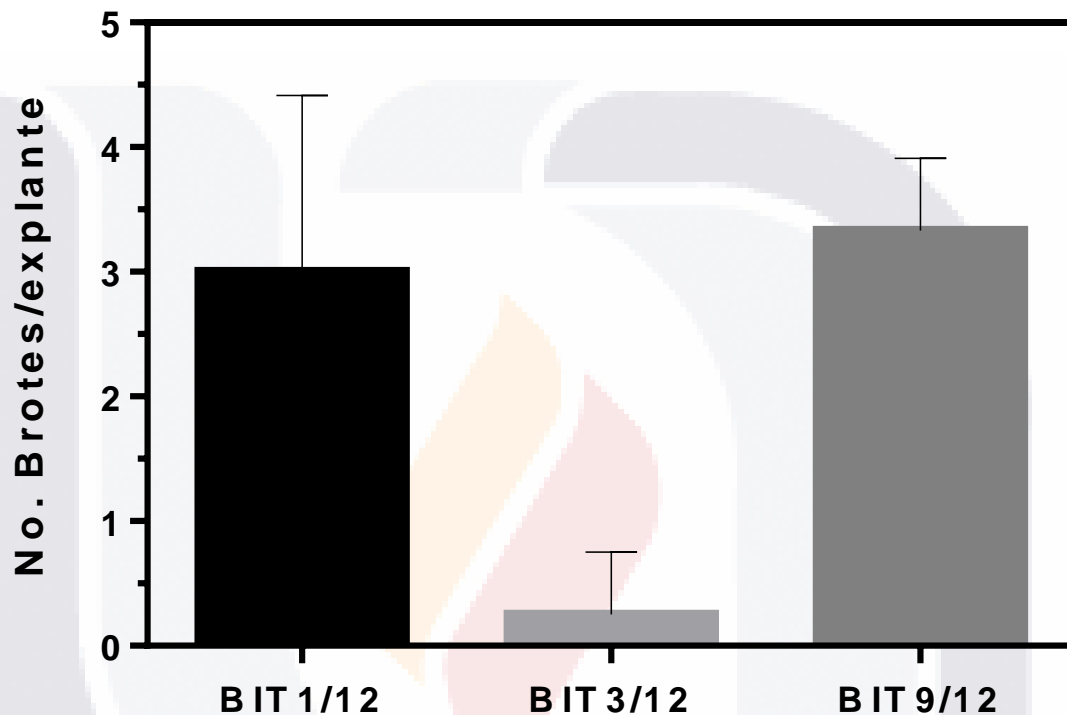


Figura 26. Proceso de optimización de *Yucca periculosa* a mayor tiempo de inmersión en BITs.

En BIT 3/12 encontramos la menor productividad para esta especie. Mientras que BIT 9/12 no resultó ser mejor condición que BIT 1/12. Barras de desviación estándar, n=2.

Etapas de aclimatación de brotes obtenidos en la etapa de optimización de BITs

En esta nueva etapa de aclimatación se empleó el proceso de sumergir los brotes obtenidos de los BITs en agua con 0.5mg/L de IBA durante 24 horas con el objetivo de inducir el crecimiento de raíz una vez trasplantados en suelo. En la Tabla 7

tenemos los resultados después de 30 días de observación en condiciones de invernadero. Los resultados de BIT 1/12 son los previamente presentados en la sección de la especie que le corresponde. En BIT 3/12 observamos que solo el 25% de los brotes trasplantados de *Yucca elata* sobrevivieron es un porcentaje muy bajo. En el caso de *Yucca coahuilense* y *Yucca periculosa* ningún brote sobrevivió al proceso de aclimatación. Para el experimento de BIT 9/12 el porcentaje de supervivencia de los brotes trasplantados fue 0% para las tres especies. Esta baja respuesta al proceso de aclimatación en suelo se puede deber a que los brotes obtenidos en estos experimentos resultaron con vitrificación, que impidió el correcto desarrollo del individuo. Los mejores resultados de supervivencia fueron encontrados en la condición de operación de 1 minuto de inmersión cada 12 horas, siendo *Yucca elata* con el mayor porcentaje seguido de *Yucca coahuilense* y por último *Yucca periculosa*.

Tabla 7. Porcentaje de supervivencia al proceso de aclimatación de los brotes obtenidos en BIT 1/12, BIT 3/12 y BIT 9/12 de las tres especies de *Yucca*.

| Especie | BIT 1/12 | BIT 3/12 | BIT 9/12 |
|--------------------------|----------|----------|----------|
| <i>Yucca elata</i> | 100% | 25% | 0% |
| <i>Yucca coahuilense</i> | 72% | 0% | 0% |
| <i>Yucca periculosa</i> | 10% | 0% | 0% |

Perfil de pH en el medio MS líquido de los BITs

Después de finalizado cada experimento se midió el pH para poder compararlo con la medición inicial. Los resultados obtenidos en la Figura 26 se pueden comparar con los datos de multiplicación de brotes, así como los de longitud de estos. Medir el pH al finalizar el experimento nos da una medida del agotamiento de los macro y micronutrientes contenidos en el medio MS líquido al arrancar este. Una reducción

en la lectura del pH nos puede indicar que los explantes consumieron los nutrientes del medio para multiplicación de brotes o para su desarrollo.

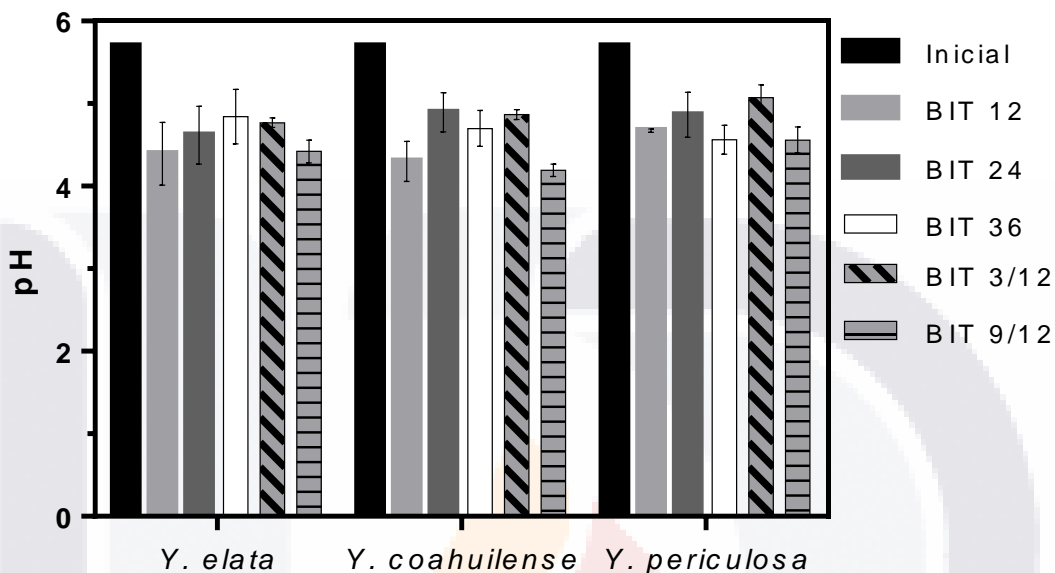


Figura 27. pH final de *Y. elata*, *Y. coahuilense* y *Y. periculosa* a diferentes tiempos de inmersión en BITs.

La especie que menos consumo de nutrientes obtuvo fue *Y. periculosa*. Barra de desviación estándar, n=2.

Contaminación en biorreactores BITs y RITAs

Es importante presentar el porcentaje de contaminación obtenido a través de la operación de los diferentes sistemas de biorreactores ya que este puede ser un indicador de la robustez que el sistema tiene para su operatividad. Lo que nos dice es qué sistema es más sencillo de armar, esterilizar, sembrar y operar, porque entre mayor sea su índice de contaminación es porque será más complicado su operación en el cuidado de la asepsia del cultivo. En la Tabla 8 tenemos presentados los diferentes sistemas de biorreactores empleados en la realización de los experimentos que consiste en dos diferentes diseños de BITs, el diseño propio y el

diseño comercial, y el biorreactor tipo RITA. Con el BIT de diseño propio se arrancaron 21 biorreactores de los cuales solamente 2 presentaron contaminación dando un porcentaje de contaminación del 10%, de los BITs fue el porcentaje más bajo presentado en este trabajo, comparado con los BITs de diseño comercial que se arrancaron 9 biorreactores y se contaminaron 2, dando un porcentaje de contaminación del 22%. En el caso de los biorreactores tipo RITA se operaron 9 y ninguno presentó contaminación por lo que su porcentaje de contaminación fue 0%.

Tabla 8. Contaminación en sistemas de biorreactores BITs diseño propio y comercial y RITAs.

| Tratamiento | Contaminados | No. Experimentos | Porcentaje Contaminación |
|-----------------------|--------------|------------------|--------------------------|
| BITs Diseño propio | 2 | 21 | 10% |
| BITs Diseño comercial | 2 | 9 | 22% |
| RITAs | 0 | 9 | 0% |

DISCUSIÓN

Construcción de biorreactores de inmersión temporal

Diseño propio

Mejorar el proceso de construcción de un sistema de biorreactores ya establecido no fue tarea fácil. El principal problema del que partí para mejorar la construcción de los primeros biorreactores fue los altos índices de contaminación, así como los problemas de fugas en los conectores que estos presentaban cada vez que se operaban. Comencé sustituyendo los antiguos conectores bronce de ¼" en forma de espiga que se oxidaban rápidamente, por unos conectores rápidos ¼" de latón recubiertos niquelado que son más resistentes a la corrosión.

Ventajas

La sujeción de las mangueras con los conectores es muy firme y confiable debido a que entra muy fácilmente a presión y para retirarla se tiene que quitar el seguro del anillo opresor interno que mantiene sujeta en su lugar a la manguera. Esto genera mucha confianza al trabajar con este sistema ya que es muy difícil que la manguera se desconecte, tenga fugas o sea un problema de contaminación. Otro punto a favor es que la relación del costo es bajo comparada con el beneficio y calidad que ofrece el conector rápido. Su instalación y limpieza es muy sencilla, se puede colocar fácilmente con las manos y terminar de dar una ligera apretada con una llave.

Desventajas

La curva de aprendizaje al principio fue un poco lenta respecto la construcción y operación, después se fue tomando mayor experiencia. Durante las primeras pruebas fue muy difícil localizar y controlar las fugas. Fue complicado trabajar en campana de flujo laminar una vez esterilizado los biorreactores. Al momento de estar enroscando la tapadera del frasco las mangueras del interior giraban con esta

y provocaba que no quedaran bien con respecto del fondo del tanque y a su vez movían de lugar el soporte junto con el explante cultivado. Al finalizar el experimento se tenía que sacar los brotes obtenidos y como la boca del frasco es más angosta que la cantidad de brotes estos resultaban dañados al momento de extraerlos.

Diseño propio escalado

Ventajas

El armado y construcción de los tanques es el mismo, solamente se modificó el modo de operar y conectar las bombas, temporizadores y se agregaron válvulas solenoides. El efecto positivo que tuvo esta modificación es que se pueden operar tres biorreactores simultáneamente con las mismas condiciones de inmersiones, utilizando solamente dos bombas de pecera, un par de temporizadores, un par de válvulas solenoides, una para llenado y otro para vaciado respectivamente, en lugar de utilizar seis bombas como anteriormente se operaban. Esto ayudó a reducir el número de equipo empleado, reducir el espacio destinado para los biorreactores en el cuarto de cultivo y el reducir la energía consumida al solo utilizar dos bombas. Además de que el costo de la implementación de este sistema fue mucho menor comparado con el costo de los biorreactores de diseño comercial.

Desventajas

Comparado con el sistema de biorreactores convencional es un poco más costoso su construcción por los nuevos componentes empleados, pero su operatividad es mucho mejor.

Diseño comercial

Ventajas

Debido a que es un sistema de biorreactores de inmersión temporal de origen comercial, es decir que una empresa los produce y vende al por mayor. Esto ahorra la etapa de adquisición de insumos y su construcción. Los biorreactores llegan pre-armados solamente para realizar pequeñas pruebas y ajustes para antes de arrancar el experimento, en el caso de los biorreactores de diseño propio puede llegar a demorar hasta una semana construir un biorreactor desde cero.

Este sistema se puede operar con una sola bomba, reduciendo así el espacio y consumo energético. Además, tiene un socket y foco al centro como fuente de iluminación para los explantes. Todos los parámetros son controlados por un controlador que es capaz de manipular el fotoperiodo, el tiempo de inmersión y la frecuencia de inmersiones.

Desventajas

Debido a que es un biorreactor comercial es costoso considerando los materiales y la calidad de construcción. Por su gran tamaño es complicado encontrar un espacio en donde localizarlo dentro del cuarto de incubación, para ello se tuvieron que poner en estantes especiales destinados solamente para estos biorreactores. Las mangueras están aseguradas a los conectores mediante unas abrazaderas metálicas, es muy difícil quitarlas con las manos por lo que se necesita la ayuda de pinzas.

Multiplicación en sistema semisólido

En la etapa de selección de las seis especies en sistema de medio semisólido no obtuvimos resultados similares comparado con los reportados por López (2014), para *Yucca carnerosana*, *Y. filifera*, *Y. filamentosa* y *Y. periculosa* obtuvo 3.0, 6.56, 6.75 y 7.6 brotes por explante respectivamente, mientras en nosotros obtuvimos 1.38, 0.96, 1.98 y 3.0 brotes por explante para cada una de las especies antes

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mencionadas, empleando los mismos reguladores de crecimiento vegetal y a las mismas concentraciones.

Micropropagación en BITs

En los experimentos realizados con *Y. elata* encontramos en la condición de BIT 12 se produjeron 10.5 brotes/explante, esto representó un aumento del 230% la productividad de brotes nuevos. Incluso en el proceso de optimización de BIT 3/12 y BIT 9/12 se logró mejorar el resultado obtenido en BIT 12.

Para el caso de *Y. coahuilense* se encontró que en el proceso de optimización con una inmersión de 3 minutos cada 12 horas la producción de brotes por explantes fue de 12.5, esto resultó ser un aumento del 329% comparado con el sistema semisólido. Cabe mencionar que estos brotes no fueron viables para su adaptación en suelo por su vitrificación en el BIT, asociado a que los explantes permanecían mucho tiempo en inmersión con el medio líquido, debido a que la vitrificación es un desorden fisiológico que afecta a las plantas en dos aspectos importantes en la fotosíntesis y el intercambio de gases CO₂ y H₂O, impidiendo su propagación y establecimiento *ex vitro* (Ziv 1990).

Los experimentos realizados con los biorreactores tipo RITA se encontraron que en ninguna de las tres condiciones RITA 12, RITA 24 y RITA 36 de operación para las tres especies pudo ser significativamente mejor que el control en sistema de medio semisólido.

Comparando los resultados reportados para otras especies del género *Yucca* tenemos que el trabajo realizado por Atta-Alla y Van Staden (1997) con *Yucca aloifolia* la mayor cantidad de brotes producidos en su trabajo fue de 6.1 brotes/explante en sistema de medio semisólido. Bentz y col (1988) su especie de estudio fue *Yucca glauca*, y en sus diferentes tratamientos con reguladores de crecimiento la máxima cantidad de brotes fue 8.1 brotes/explante en sistema de medio semisólido. En un estudio más reciente de micropropagación de *Yucca valida*

por Arce-Montoya y col (2006), la máxima producción en medio semisólido fue de 5.25 brotes/ explante. Estos resultados reportados son inferiores a la cantidad de brotes obtenidos en sistema de biorreactores de inmersión temporal BIT presentados en el presente trabajo de investigación. Podemos inferir que es viable utilizar BIT para la micropropagación de especies del género *Yucca*.

A partir de estos datos podemos decir que los BITs de diseño propio son confiables, fáciles de armar y operar, ya que su porcentaje de contaminación es muy bajo. Los RITA no presentaron ninguna contaminación, debido al pequeño espacio en donde se encuentran los explantes su micropropagación no fue mayor comparada con los BITs por lo que para las especies estudiadas no es recomendable utilizar para su multiplicación.

La longitud de los brotes puede ser un indicador para saber en qué momento podemos retirarlos del BIT y pasarlos a suelo para poder tener una mayor probabilidad de supervivencia *ex vitro*.

El proceso de enraizamiento de los brotes provenientes de BITs en medio semisólido no resultó una estrategia que asegurara la producción de raíz en sus explantes ya que los experimentos realizados su porcentaje de enraizamiento fue bajo menores al 33% a excepción de *Y. coahuilense* BIT24 (100%) y *Y. periculosa* (78%).

CONCLUSIONES

En la micropropagación en sistema de medio semisólido las especies que generaron una mayor cantidad de brotes por explantes fueron: *Yucca elata*, *Yucca coahuilense* y *Yucca periculosa*.

La micropropagación de *Yucca elata* mediante BIT con una inmersión de 1 minuto cada 12 horas mostró ser una mejor propuesta para obtener mayor número de brotes por explante (10.5) comparado con el sistema en cultivo semisólido (4.7).

En *Yucca coahuilense* se pudo observar la mejor condición para micropropagar en BIT fue con una inmersión de 1 minuto cada 12 horas con un promedio de 4.5 brotes/explante, en comparación el control en medio semisólido de 3.8 brotes/explante.

Con *Yucca periculosa* el sistema de micropropagación en biorreactores de inmersión temporal no resultó ser significativamente mejor comparado con el control en medio semisólido 3.0 brotes/explante, ya que encontró una productividad del 3.0 brotes/explante en BIT 12 y una productividad de 3.3 brotes/explante con BIT 9/12.

Los biorreactores tipo RITA no resultaron adecuados para la micropropagación de las especies *Yucca elata* y *Yucca periculosa*; la excepción fue para *Yucca coahuilense* que en RITA 24 logró producir 6 brotes/explante comparado con su control 3.8 brotes/explante en medio semisólido.

El máximo porcentaje de aclimatación a suelo del 100% en *Y. elata* BIT 12, 100% en *Y. coahuilense* BIT 24 y del 75% en *Y. periculosa* BIT 36.

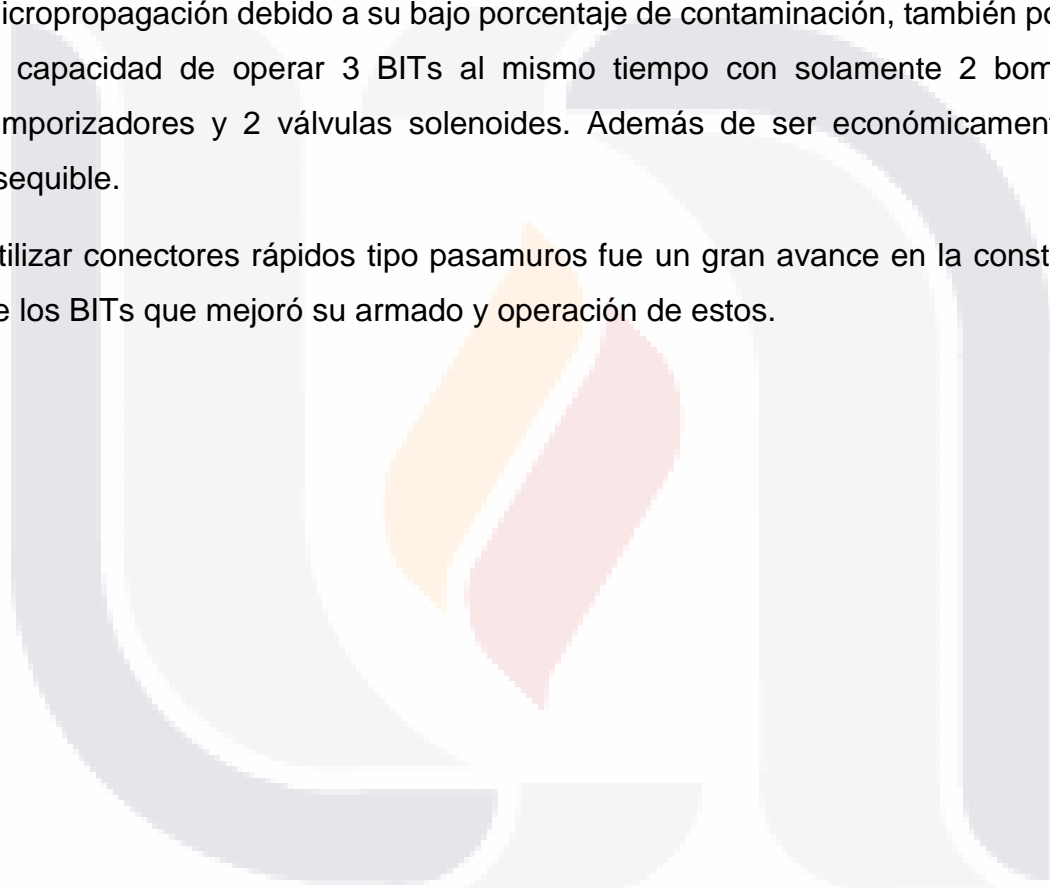
En el proceso de optimizar la micropropagación de los brotes en los BITs se encontró que aumentando el tiempo de inmersión a 3 min y 9 min cada 12 horas si aumentaba la productividad de los brotes, pero también alteraba morfológicamente los explantes produciendo vitrificación, debido al incremento del tiempo de

exposición del tejido con el medio líquido. Esto también provocó que la adaptación a suelo no se llevara a cabo y que los brotes murieran en el proceso.

El diseño propio de BITs fue un sistema fácil de armar, manipular y operar debido a su bajo porcentaje de contaminación del 10% comparado con los BITs de diseño comercial con 22% de contaminación.

El diseño propio escalado resultó ser una buena alternativa para la micropropagación debido a su bajo porcentaje de contaminación, también por tener la capacidad de operar 3 BITs al mismo tiempo con solamente 2 bombas, 2 temporizadores y 2 válvulas solenoides. Además de ser económicamente más asequible.

Utilizar conectores rápidos tipo pasamuros fue un gran avance en la construcción de los BITs que mejoró su armado y operación de estos.



REFERENCIAS

- Abdelnour-Esquivel, Ana, y Jean Vicent Escalant. 1994. "Conceptos basicos del cultivo de tejidos vegetales". Costa Rica.
- Albard, D., F. Cote, y C. Teisson. 1993. "Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 55–60.
- Arce-Montoya, Mario, Margarito Rodríguez-Álvarez, Julio A. Hernández-González, y Manuel L. Robert. 2006. "Micropropagation and field performance of *Yucca valida*". *Plant Cell Reports* 25(8): 777–83.
- Atta-Alla, H., y J. Van Staden. 1997. "Micropropagation and establishment of *Yucca aloifolia*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48(3): 209–12.
- Bentz, Susan E., Bruce J. Parliman, Helen Jean Talbott, y William L. Ackerman. 1988. "Factors affecting in vitro propagation of *Yucca glauca*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 14(2): 111–20.
- Bononi, M., G. Guglielmi, P. Rocchi, y F. Tateo. 2013. "First data on the antimicrobial activity of *Yucca filamentosa* l. bark extracts". *Ital. J. Food Sci.* 25: 238–42.
- Escalona, M. et al. 1999. "Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems". *Plant Cell Reports* 18(9): 743–48.
- Guillot Ortiz, Daniel, y Piet Van Der Meer. 2008. "El género *Yucca* L. en España". ed. Jolube Consultor y Editor Ambiental. Valencia.
- Hvolslef-Eide, Anne Kathrine, y Walter Preil. 2005. "Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation". Netherlands: Springer.
- James, Craig D. et al. 1993. "Pollination ecology of *Yucca elata* - An experimental study of a mutualistic association". *Oecologia* 93(4): 512–17.
- Kaneda, Norito, Hiroyuki Nakanishi, y E. John Staba. 1987. "Steroidal constituents of *Yucca shidigera* plants and tissue cultures". *Phytochemistry* 26(5): 1425–29.
- López-Ramírez, Yessica. 2014. "Cultivo y propagación in vitro de especies mexicanas del género *Yucca*". Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- López Flores, Virgilio. 1988. "Investigación y aprovechamiento en el Altiplano

Potosino de la *Yucca filifera*, *Yucca decipiens* y *Yucca carnerosana*".
Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

- Maiti, Ratikanta, y Humberto Gonzalez Rodriguez. 2011. "The Native *Yucca*: a Boon to the Farmers of the Arid North-east Mexico". *International Journal of Bio-resource and Stress Management* 2(2): 203–8.
- Massey, LK, y JL Hamrick. 1999. "Breeding structure of a *Yucca filamentosa* (*Agavaceae*) population". *Evolution* 53(4): 1293–98.
- Mellado, M. et al. 2009. "Effects of replacement of alfalfa by inflorescences of *Yucca carnerosana* in the diet on performance of growing goats". *Livestock Science* 123(1): 38–43.
- Rentería, Laura, y César Cantú. 2003. "El efecto de *Tegeticula yuccasella* Riley (Lepidoptera : *Prodoxidae*) sobre la fenología reproductiva de *Yucca filifera* Chabaud (*Agavaceae*) en Linares , N . L . , México". *Acta Zoológica Mexicana* 92: 85–92.
- Torres, Patricio et al. 2003. "Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*". *Phytochemistry* 64(2): 463–73.
- Ziv, M. 1990. *Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants*. Kluwer Academic Publishers incorporates

ANEXO

Medio de cultivo Murashige Skoog (MS)

Para la preparación del medio de cultivo MS primero se tuvieron que preparar las soluciones stock como a continuación se indica.

Soluciones concentradas para el medio MS

Solución A

Concentración: 1000X Volumen: 50mL

Cloruro de calcio $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 22.0g

Solución B

Concentración: 1000X Volumen: 50mL

Yoduro de potasio KI 41.5mg

Cloruro de cobalto $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.25mg

Solución C

Concentración: 400X Volumen: 50mL

Fosfato de monobásico de K KH_2PO_4 3.4g

Ácido bórico H_3BO_3 0.124g

Molibdato de sodio NaMoO_4 0.005g

Solución D

Concentración: 400X Volumen 50mL

Sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.4g

Sulfato de manganeso $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.340g

| | | |
|------------------|---|--------|
| Sulfato de zinc | $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.172 |
| Sulfato de Cobre | $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.50mg |

Solución E

Concentración: 200X Volumen: 100mL

| | | |
|-----------------|---|--------|
| Sulfato ferroso | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.557g |
| EDTA disódico | Na_2EDTA | 0.745g |

Solución F

Concentración: 100X Volumen: 100mL

| | | |
|----------------|--|--------|
| Glicina | | 20.0mg |
| Piridoxina HCl | | 5.0mg |
| Tiamina HCl | | 1.0mg |
| Mio inositol | | 1.0g |
