



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL USO DE BIORREACTORES EN LA
MICROPROPAGACIÓN DEL AGAVE MEZCALERO MADRECOIXE (*AGAVE
KARWINSKII*).**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERA QUÍMICA**

PRESENTA

ERIKA JUDITH ANAYA ARCOS

ING. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.

AÑO 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: EDUARDO BARZANA GARCÍA

VOCAL: Profesor: JUAN MARIO MORALES CABRERA

SECRETARIO: Profesor: TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

1er. SUPLENTE: Profesor: OSCAR HERMANA MELÉNDEZ

2° SUPLENTE: Profesor: HECTOR JAVIER MARTÍNEZ GRIMALDO

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, EN LA FACULTAD DE QUÍMICA.

ASESOR DEL TEMA:

I.A. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN D. ARACELY ARANDAL MARTÍNEZ

Contenido

ABREVIATURAS.....	6
INDICE DE CUADROS	7
INDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE TABLAS	10
RESUMEN	12
1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	13
1.1. Aspectos generales de <i>Agave karwinskii</i>	13
1.1.1. Clasificación taxonómica y descripción botánica	13
1.1.2. Centro de origen y distribución	15
1.1.3. Usos	16
1.1.4. Problemas ecológicos que afectan las diferentes especies de agaves mezcaleros silvestres	18
1.2. Cultivo de tejidos Vegetales	19
1.2.1. Factores que regulan la regeneración <i>in vitro</i>	20
1.2.2. Vías regenerativas: Organogénesis y embriogénesis somática	21
Organogénesis.....	21
Embriogénesis somática	21
Clasificación por el sistema de agitación.....	22
Clasificación de acuerdo al sistema de inmersión.....	23
2. JUSTIFICACIÓN	28
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo General	30
3.2. Objetivos particulares.....	30
4. MATERIALES Y METODOS	31

4.1.	Material biológico	31
4.2.	Aspectos generales.....	32
4.2.1.	Preparación de medios de cultivo.....	32
4.2.2.	Condiciones de incubación.....	32
4.3.	Método de desinfección de semillas	33
4.4.	Germinación <i>in vitro</i>	33
4.5.	Organogénesis <i>in vitro</i>	34
4.5.1.	Etapa 1: Inducción de la organogénesis a través de brotes adventicios 34	
4.5.2.	Etapa 2: Proliferación de los brotes adventicios	35
4.5.3.	Etapa 3: Enraizamiento de brotes adventicios.....	35
4.6.	Embriogénesis somática	35
4.6.1.	Etapa 1: Inducción de la embriogénesis somática.....	35
4.6.2.	Etapa 2: Proliferación de callos embriogénicos	36
4.6.3.	Etapa 3: Desarrollo y germinación de los embriones somáticos.....	36
4.7.	Uso de los biorreactores.	37
4.7.1.	Construcción de los biorreactores	37
4.7.2.	Inducción de la organogénesis a través del uso de los biorreactores	38
5.	RESULTADOS.....	42
5.1.	Desinfección de semilla.....	42
5.2.	Germinación <i>in vitro</i>	42
5.3.	Organogénesis <i>in vitro</i>	44
5.3.1.	Etapa 1: Inducción de la organogénesis a través de brotes adventicios 44	
5.3.2.	Etapa 2: proliferación de brotes adventicios	46
5.3.3.	Etapa 3: enraizamiento de brotes adventicios	51

5.4. Embriogénesis somática	53
5.4.1. Etapa 1: Inducción de la embriogénesis somática	53
5.4.2. Etapa 2: Proliferación de callos embriogénicos	53
Curvas de crecimiento de callo	56
5.4.3. Etapa3: Desarrollo y germinación de embriones	59
5.5. Uso de los biorreactores	65
5.5.1. Construcción de los biorreactores	65
Tratamiento A.....	65
5.5.2. Inducción de la organogénesis a través del uso de los biorreactores	67
Tratamiento A.....	67
Tratamiento B.....	67
Tratamiento C	67
Tratamiento D	68
6. DISCUSIÓN	71
6.1. Desinfección de semilla.....	71
6.2. Germinación <i>in vitro</i>	71
6.3. Organogénesis <i>in vitro</i>	71
6.4. Embriogénesis somática	72
6.5. Uso de los biorreactores	73
7. CONCLUSIONES	74
1. ANEXOS	76
Bibliografía	78

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AG3	Ácido giberélico
ANA	Ácido naftalenacético
BA	Benciladenina
MS	Medio de sales inorgánicas de Murashige y Skoog (1962)
N6	Medio de Chu et al. (1975)
P	Planta
S	Semilla
S/R	Sin regulador de crecimiento

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro no. 1. Clasificación taxonómica del <i>Agave karwinskii</i> (López Urrutla, 2004).	12
Cuadro no. 2. Condiciones probadas por diferentes autores para la micropropagación de agaves utilizando biorreactores BIT.	25
Cuadro no. 3. Etapas de la parte experimental para la obtención de embriones y plántulas en biorreactores.	29

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura no. 1. <i>Agave karwinskii</i> . Conocido como madrecoixe (Cuanax, 2018).	12
Figura no. 2. Distribución del <i>Agave karwinskii</i> (CONABIO, 2006).	14
Figura no. 3. Madrecoixes en Miahuatlán de Porfirio Díaz (Angeles del agave, 2018).	14
Figura no. 4. Partes del <i>Agave karwinskii</i> .	15
Figura no. 5. Partes del escape floral (CONABIO, 2012).	16
Figura no. 6. Sistemas de Inmersión Temporal. A) Sistema BIT. B) Sistema RITA®. C) Sistema BIG (Bello Bello, Martínez Estrada, & et al., 2014).	24
Figura no. 7. Semillas de la planta 1 de <i>Agave madrecoixe</i> , colectadas en Santiago Matatlán.	29
Figura no. 8. Semillas de A. Madrecoixe en medio N6p de la planta 1.	32
Figura no. 9. Esquema del sistema del biorreactor del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.	35
Figura no. 10. Esquema del sistema de biorreactor BIT. El primer contenedor con medio de cultivo y el segundo con brotes adventicios.	36

Figura no. 11. Germinación y formación de callo. A) Plántulas con formación de callo en la base en medio N6i. B) Plántula que no siguió su desarrollo.	41
Figura no. 12. Germinación de semillas de <i>Agave karwinskii</i> . A) Fotografía tomada con microscopio estereoscópico de una semilla germinada en medio MS y en fotoperiodo. B) Semillas del lote 3 en medio MS después de 3 semanas de germinación.	42
Figura no. 13. Plantas obtenidas por germinación de semilla. A) Planta obtenida a las 3 semanas de incubación del lote 2. B) Plantas en desarrollo del lote 2.	42
Figura No. 14. Comparación del tamaño de 2 agaves en medios diferentes. El agave de mayor tamaño se encuentra en medio T1 mientras que el otro se encuentra en medio MS.	44
Figura no. 15. <i>Agave karwinskii</i> en medio T4 en el segundo subcultivo.	44
Figura no. 16. <i>Agave karwinskii</i> en medio T4 en el tercer subcultivo.	45
Figura no. 17. <i>Agave Karwinskii</i> en medio T1 en el cuarto subcultivo. El agave presenta la formación de raíces, así como de espinas en las hojas, pero no la producción de brotes o de callo.	45
Figura no. 18. <i>Agave karwinskii</i> en medio T3 en el cuarto subcultivo. Producción de varios brotes adventicios de una semilla, sin callo y sin raíz.	46
Figura no. 19. Callo de la planta 5 en medio T1, subcultivado a medio N6p.	47
Figura no. 20. Fotografía tomada con microscopio estereoscópico al callo embriogénico de <i>Agave karwinskii</i> de la planta 1 en medio T4, subcultivado a medio N6p.	47
Figura no. 21. Número de brotes en los medios T1, T2, T3, T4 después de varios subcultivos.	48
Figura no. 22. Plantas obtenidas del lote 3 en medio MS: A) Segundo subcultivo a medio MS. B) 3° subcultivo en medio MS. C) 7° subcultivo en medio MS	.49
Figura no. 23. Brotes individualizados en medio MS al 50% provenientes del medio T3. A) Brote de la semilla 2 de la P1. B) Brote de la semilla 8 de	50

la P3.

Figura no. 24. Agaves del lote 3 de diferentes semillas en medio MS al 50%.	50
Figura no. 25. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico a los 4 subcultivos. A Proliferación de callo en medio N6p de la planta 1. B proliferación del callo en medio N6p de la planta 3.	52
Figura no. 26. Callo de la planta 3 subcultivado por tercera vez en medio N6p	52
Figura no. 27. Callo (P1) después de 3 subcultivos. A) Proliferación de callo en medio N6p. B) Proliferación del callo en medio N6pm. C) Proliferación del callo en medio N6pm1.	53
Figura no. 28. Cinética de crecimiento de callo <i>A. karwinskii</i> en los medios N6p, N6pm y N6pm1.	55
Figura no. 29. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico a los 7 subcultivos de la proliferación de callo: A) En medio N6pm1 de la planta 1. B) En medio N6p de la planta 3. C) En medio N6pm de la planta 1.	55
Figura no. 30. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico a los 7 subcultivos de la proliferación de callo en medio N6pm1 de la planta 3.	56
Figura no. 31. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico. Callo con brotes proveniente del medio N6pm1-G2 después del 1° subcultivo.	57
Figura no. 32. El primer frasco a la izquierda es callo en medio N6p-G2, el segundo frasco es callo en medio N6p-G1. Ambos frascos subcultivados por décima vez.	58
Figura no. 33. El primer frasco a la izquierda es callo en medio N6pm1-G2, el segundo frasco es callo en medio N6pm1-G1. Ambos frascos subcultivados por décima vez.	58
Figura no. 34. Los primeros dos frascos a la izquierda están en medio N6p-G2, los dos frascos a la derecha están en medio N6p-G1.	59
Figura no. 35. Obtención de callos embriogénicos de diferentes semillas de la planta 1, al segundo subcultivo. Los cultivos provenientes de las semillas 3, 5, 6 y 8 no proliferaron los callos.	61

Figura no. 36. No. de frascos con callos embriogénicos de diferentes semillas de la planta 1.	61
Figura no. 37. Fotografía tomada con microscopio estereoscópico de la proliferación de callo de la semilla 7 en el subcultivo no. 8.	62
Figura no. 38. Callo de la semilla 9 del lote 3 en medio MsE.	62
Figura no. 39. Establecimiento del tratamiento A.	63
Figura no. 40. Establecimiento del tratamiento B.	63
Figura no. 41. Establecimiento del tratamiento C.	64
Figura no. 42. Establecimiento del tratamiento D.	64
Figura no. 43. Agaves después de cuatro semanas en el tratamiento B.	65
Figura no. 44. Agaves después de 4 semanas en el tratamiento C.	66
Figura no. 45. Agaves con sus respectivos brotes del contenedor 2.	67
Figura no. 46. Agaves después de dos semanas en medio sólido T3.	67

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla no. 1. Sales y reguladores de crecimiento utilizados en los medios de cultivo en las diferentes etapas de la micropropagación.	30
Tabla no. 2. Medios de cultivos probados en diferentes lotes para la germinación de semillas.	32
Tabla no. 3. Medios de cultivo para la inducción de brotes adventicios (organogénesis).	33
Tabla no. 4. Medios de cultivo para la proliferación de callos embriogénicos.	34
Tabla no. 5. Medios de cultivo para la germinación de los embriones somáticos.	34
Tabla no. 6. Parámetros para el establecimiento de los tratamientos en los biorreactores.	37
Tabla no. 7. Parámetros de los agaves in vitro para el establecimiento de	38

los biorreactores.

Tabla no. 8. Porcentaje de germinación de diferentes lotes de semilla de <i>A. karwinskii</i> sembrados en dos medios de cultivo.	40
Tabla no. 9. No. de plantas obtenidas del segundo subcultivo en MS sin reguladores de crecimiento del lote 2, de diferentes plantas.	43
Tabla no. 10. Número de brotes totales de dos semillas por planta cultivados en los medios T1, T2, T3 y T4 hasta el segundo subcultivo	43
Tabla no. 11. Número de semillas con callo y número de brotes de dos semillas por planta cultivados en los medios T1, T2, T3 y T4.	46
Tabla no. 12. Clasificación del tamaño de los brotes individualizados en los medios T1, T2, T3 y T4.	49
Tabla no. 13. Número de frascos con callo de <i>A. karwinskii</i> sembrados en tres medios de cultivo del lote 2.	53
Tabla no. 14. Número de frascos con callo de <i>A. karwinskii</i> sembrados en tres medios de cultivo del lote 2, 7° subcultivo.	56
Tabla no. 15. Número de frascos con callo de <i>A. karwinskii</i> sembrados en tres medios de cultivo del lote 2, 8° subcultivo.	57
Tabla no. 16. Número de frascos con callo de <i>A. karwinskii</i> sembrados en tres medios de cultivo del lote 2, 9° subcultivo.	59
Tabla no. 17. No. De frascos con callo de <i>A. karwinskii</i> sembrados en medio N6p por semilla obtenidos en diferentes subcultivos lote 3.	60
Tabla no. 18. Comparación de los resultados para el establecimiento de los biorreactores.	68

RESUMEN

El *Agave karwinskii* con preferencia por los suelos calizos de zonas áridas y de poca lluvia, limita su distribución de la Cañada de Tehuacán en Puebla, al sur de los Valles Centrales de Oaxaca, y en algunas zonas en Veracruz, entre 750 y 2000 metros de altitud, por lo que se dice que es micro-endémico (Montes Vásquez, 2014). Actualmente su uso principal es como materia prima para la elaboración de mezcal (Palma, 2016). Sin embargo, la producción de mezcal se enfrenta a la problemática de falta de materia prima (piñas de diferentes especies de Agaves mezcaleros) y la falta de variabilidad genética que se tiene en los individuos. Como una alternativa se ha planteado la micropropagación del agave madrecoixte a través de semillas obtenidas por diferentes plantas. El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una herramienta biotecnológica que permite el cultivo y la manipulación de células, tejidos y órganos vegetales para la regeneración de plantas completas. Con el fin de mejorar las técnicas de producción de agave madrecoixte y solucionar el problema de falta de materia prima, se ha implementado el uso de biorreactores para el CTV. Para ello se utilizaron semillas de ejemplares silvestres de *Agave karwinskii*, colectadas en Santiago Matatlán, Oaxaca, en marzo de 2017. Primeramente, se germinaron las semillas bajo dos condiciones, con y sin remojo, lográndose la germinación preferentemente con remojo. Posteriormente se probaron diferentes medios para regenerar por dos vías morfogénicas: organogénesis y embriogénesis somática. Se logró la regeneración con ambos sistemas. La vía regenerativa que diferenció brotes de forma más rápida fue la organogénesis por lo que estos brotes obtenidos se utilizaron para los ensayos de los biorreactores. En el ensayo de biorreactores se implementó el sistema inmersión temporal de frascos gemelos. Los tratamientos probados fueron A y B: 2 min de inmersión cada 6 horas, C: 5 min de inmersión cada 12 horas y D: 5 min de inmersión cada 24 horas. De los tres tratamientos en los biorreactores, el tratamiento D presentó resultados satisfactorios en la formación de brotes ya que se sembraron 11 brotes en total de las dos repeticiones y al final se obtuvieron 36 brotes en ambas repeticiones.

1. REVISIÓN DE LITERATURA

El Agave es uno de los símbolos de las culturas, tradiciones y costumbres mexicanas; surgió hace unos 8 millones de años en el Altiplano Mexicano, donde muchas especies de agaves ampliaron su distribución debido a su resistencia a condiciones de sequía (CONABIO, 2012).

Existen alrededor de 210 especies, 159 se encuentran en México, es decir, 75% del total, con 119 de ellas endémicas (CIATEJ, 2017).

1.1. Aspectos generales de *Agave karwinskii*

El *Agave karwinskii* es una especie endémica de América, presenta aspectos morfológicos muy variables (cambia su altura o grosor, así como el color, tamaño y forma de sus hojas) debido a las diferentes poblaciones, por lo que existe una gran diversidad de variables locales con distintos nombres comunes reconocidos por pobladores y productores sobre todo en la región mezcalera de Oaxaca (Mezcaloximoron, 2017).

1.1.1. Clasificación taxonómica y descripción botánica

El *Agave karwinskii* debe su nombre a que el naturalista alemán Joseph Gerhard Zuccarini, quien describió taxonómicamente esta especie, Joseph quiso dedicárselo al Barón Wilhelm Friedrich von Karwinsky von Karwin, quien vivió en Oaxaca entre los años de 1827 al 1832. El género *Agave* proviene del latín *Agave* y del vocablo griego *Agavé* que significa noble, ilustre, brillante y admirable y, fue propuesto por el naturista Carlos Lineo en 1753. La clasificación taxonómica de esta especie se presenta en el Cuadro 1.

El agave también es conocido como maguey, según algunas versiones “maguey” es una palabra de origen antillano que introdujeron los españoles para referirse al agave (Sánchez et al., 2016).

Cuadro no. 1. Clasificación taxonómica del *Agave karwinskii* (López Urrutla, 2004).

Reino	•Plantae
Subreino	•Tracheophyta
Filo	•Magnoliophyta
Clase	•Liliopsida
Orden	•Asparagales
Familia	•Asparagaceae
Subfamilia	•Agavoideae
Género	•Agave
Especie	• <i>Agave karwinskii</i>
Nombre común	•Madrecuixe

El agave *karwinskii* es una especie silvestre que se ha ganado numerosos nombres indígenas y mestizos según el lugar en donde crecen tales como tobasiche, bicuixe, barril verde/amarillo/blanco, cirial, tripón y madre cuixe. En la Figura no. 1 podemos observar un ejemplo de agave madre cuixe.



Figura no. 1. *Agave karwinskii*. Conocido como madre cuixe (Cuanax, 2018).

El agave madre cuixe es una de las muchas variedades de la especie *Agave karwinskii* y, se reproduce por hijuelos y por semillas. Su inflorescencia es ramificada hasta 3.5 m de alto por encima de la planta (CONABIO, 2012).

A diferencia de las otras variedades crece en tallos que pueden alcanzar hasta 1.5 m de altura con una piña que mide en promedio 1.5 m de ancho y 1.5 m

de alto, dando como resultado una planta que puede alcanzar alturas de hasta 2.5 m. Es un agave cilíndrico alto y salvaje con espinas pequeñas y, con hojas rectas y angostas color verde oscuro que crecen desde la base a diferencia del tobaciche que va dejando caer sus hojas inferiores a medida que crece, dejando su piña cilíndrica seca y desnuda (Del Maguey Single Village Mezcal, 2015).

Madrecuixe típicamente tiene una piña más grande que cuixe, sin embargo, los cuixe no son parte del madre cuixe, los madre cuixes a menudo crecen como plantas solitarias rodeadas por varios cuixe, como si estuvieran protegiendo, como una planta "madre", de ahí su nombre (Angeles del agave, 2018).

1.1.2. Centro de origen y distribución

México es el centro de mayor riqueza y diversidad de agaves, por lo que se ha sugerido como su centro de origen y distribución (García Marín, 2006).

Los magueyes, agaves o mezcales, como también se les conoce, se distribuyen en regiones del país con climas secos, altas temperaturas y escasa precipitación, entre los 1000 y 2000 metros. Se encuentran en las planicies, las montañas, los acantilados y también en los picos montañosos, más allá de los 3000 metros de altitud (Montes Vásquez, 2014).

El agave para la elaboración del mezcal crece en los estados de Guerrero, Oaxaca, Puebla, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas. Se considera que los mejores mezcales se producen en la llamada región mezcalera del estado de Oaxaca que comprende los municipios de Sola de Vega, Miahuatlán, Yautepec, Santiago Matatlán, Tlacolula, Ocutlán, Ejutla y Zimatlán (Diario Oficial de la Federación, 2003).

El *Agave karwinskii* con preferencia por los suelos calizos de zonas áridas y de poca lluvia, limita su distribución de la Cañada de Tehuacán, en Puebla, al sur de los Valles Centrales de Oaxaca y en algunas zonas en Veracruz (figura no. 2),

entre 750 y 2000 metros de altitud, por lo que se dice que es micro-endémico (Montes Vásquez, 2014).



Figura no. 2. Distribución del *Agave karwinskii* (CONABIO, 2006).

1.1.3. Usos

Desde la época Prehispánica, el Agave ha tenido múltiples usos como una fuente de alimento, fibra, material de construcción, forraje y como materia prima para la producción de un sin fin de productos (Sánchez et al., 2016).

Se usa como cerca viva en la delimitación de terrenos ya que las plantas adultas proporcionan sombra y humedad a las plantas más pequeñas (figura no. 3). Su tronco se usa para leña y sus hojas se utilizan para la extracción de fibras y como alimento por su gran dulzura (Montes Vásquez, 2014).



Figura no. 3. Madrecoixes en Miahuatlán de Porfirio Díaz (Angeles del agave, 2018).

Actualmente su uso principal es como materia prima para la elaboración de mezcal, a pesar de que los mezcales elaborados de esta especie son elaborados solamente en Oaxaca y el sur de Puebla. Cabe mencionar que algunos maestros mezcaleros caracterizan el mezcal elaborado de *Agave karwinskii* como un mezcal aromático que siempre deja un sabor ligeramente amargo (Palma, 2016).

Los agaves *karwinskii* deben tener una maduración mínima de 8 años para la elaboración de mezcal, y se identifica cuando el quiote (nombre regional de la inflorescencia) mide el tamaño del agave entonces, momento en el cual debe cortarse. Si el quiote no se corta en ese momento puede llegar a medir hasta 3 metros y se produce el escape floral y con ello la producción de semillas, pero el agave ya no sirve para la elaboración de mezcal (Figura no. 4) (comunicación personal del Ing. Miguel Ángel López Vázquez, 2018).

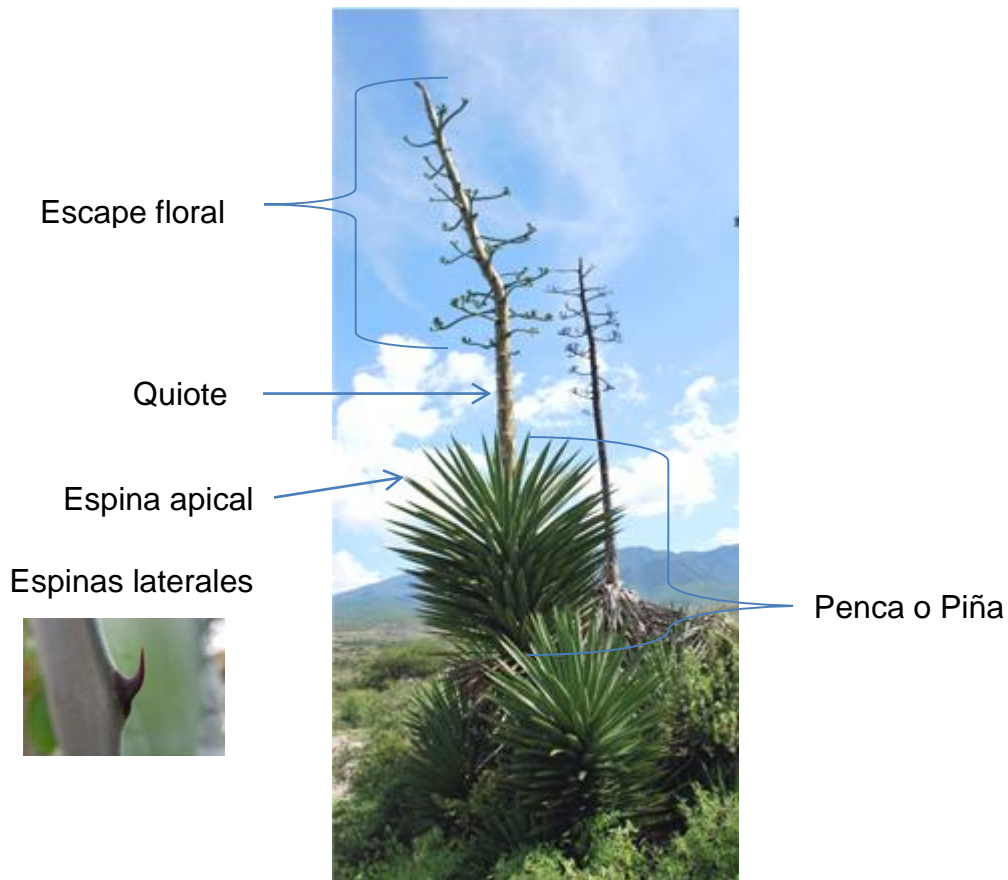


Figura no. 4. Partes del *Agave karwinskii*.

También pueden formarse hijuelos en las inflorescencias, llamados bulbillos (figura no. 5), pero cuando el quiote es eliminado para aprovechar la piña (nombre regional del tallo de esta planta) de igual forma no se logra la propagación (Arzate Fernández, 2016).

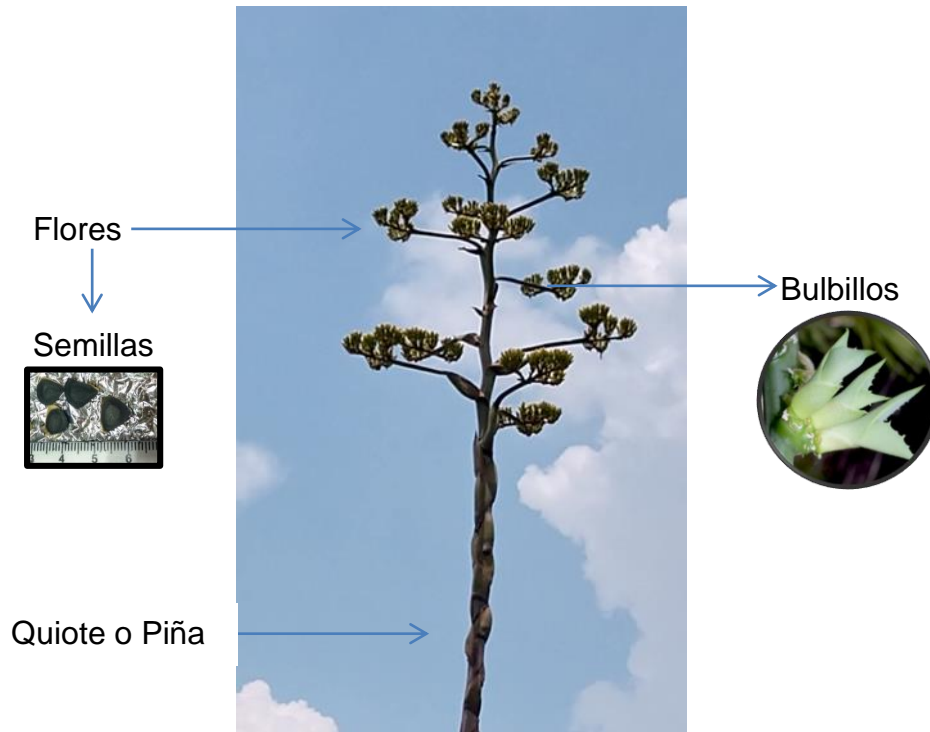


Figura no. 5. Partes del escape floral (CONABIO, 2012).

1.1.4. Problemas ecológicos que afectan las diferentes especies de agaves mezcaleros silvestres

Uno de los principales problemas que enfrenta el género *Agave* es que no existe ningún trabajo de clasificación que abarque todas sus especies (Mendoza, 2007).

En esto influye que la distribución de los agaves silvestres es altamente asimétrica, pueden ser especies localmente abundantes, pero en ocasiones se restringen a las zonas de origen. La provincia del Valle de Tehuacán, en los límites de Oaxaca y Puebla, cuenta con ocho especies micro endémicas, incluyendo el

Agave karwinskii, siendo el área con mayor riqueza de agaves en el país, seguida de las montañas del este de Chiapas, en los límites con Oaxaca (Mendoza, 2007).

También se debe a la capacidad de dispersión, germinación de sus semillas, así como a sus interacciones bióticas con otros organismos, como los polinizadores, y a factores como los eventos históricos que han tenido lugar en Norteamérica, los cuales han influenciado la distribución actual de las especies. Las especies de *Agave* crecen en un gran número de hábitats de México, desde el nivel del mar hasta 3 400 metros de altitud, aunque son más comunes entre 1 000 y 2 000 metros (Mendoza, 2007).

1.2. Cultivo de tejidos Vegetales

El Cultivo de Tejidos Vegetales es un conjunto de técnicas pertenecientes a la Biotecnología, en particular del área que tiene como objeto el estudio a las plantas, es decir, la biotecnología vegetal. Estas técnicas se basan en la totipotencialidad celular, la cual postula que toda célula vegetal individual es capaz de regenerar una planta entera a partir de un cultivo *in vitro*, sin importar el grado de diferenciación alcanzado (Rivero, 2018). Estas técnicas son utilizadas en la propagación masiva de diferentes especies. Así mismo han sido una herramienta en programas de mejoramiento genético a través de selección de mutantes, fusión de protoplastos y la integración de genes de interés. Sin embargo el uso más recurrente es en la micropropagación o propagación de especies de interés agrícola (Calva Calva & Pérez Vargas, 2005).

El cultivo *in vitro* consiste en cultivar tejidos, órganos o células bajo condiciones asépticas, en la que a partir de un pequeño segmento inicial de tejido es posible regenerar en poco tiempo plantas genéticamente iguales a la planta madre, limitando las condiciones naturales en las que crece la planta y aprovechando la totipotencialidad de las células (Rubio & Hernández, 2013).

1.2.1. Factores que regulan la regeneración *in vitro*

La totipotencialidad está modulada por factores intrínsecos de la planta donadora (estado fisiológico, posición del órgano, concentraciones endógenas de las hormonas, etc.) y externos tales como:

Origen del explante: Un explante puede provenir de cualquier parte de la planta ya sea un órgano, tejido o células. Pueden ser tallos, hojas, pétalos de flores, raíces, embriones, cotiledones, etc.

Medio de cultivo: Es la solución que cuenta con los nutrientes necesarios para germinar, multiplicar, aislar o regenerar tejidos o células según corresponda. Pueden ser utilizados en estado sólido o líquido.

La composición de los medios de cultivo varían según el contenido y las cantidades de sales, por ello en la literatura se pueden encontrar muchas formulaciones, las más utilizadas son el medio MS (Murashige y Skoog, 1962), N6 (Chu, *et al*, 1975), B5 (Gambor 1982), SH (Shenk y Hildebrandt 1972); Whithe, WPM (McCown and Sellmer, 1981) y otros más. Así mismo, los medios de cultivo deben contener una fuente de carbono como sacarosa, fructosa, maltosa u otro sacárido. Las vitaminas esenciales son la tiamina, ácido nicotínico y piridoxina, como aminoácido se utiliza la glicina generalmente, salvo que, en diversas especies, especialmente para inducir la embriogénesis somática se recomienda, L-asparagina, L-prolina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, entre otros.

Los reguladores de crecimiento son parte importante en la composición de los medios de cultivo. Overbeek (1941) observa el efecto de una sustancia presente en el agua de coco que estimulaba la división celular. Cuando el agua de coco se combinaba con 2,4-D, tenía un efecto positivo en el desarrollo de tejidos de zanahoria y papa (Caplin y Steward 1948, 1952).

Factores físicos: Los factores físicos que determinan la respuesta morfogenética son: luz, fotoperiodo, pH y temperatura.

1.2.2. Vías regenerativas: Organogénesis y embriogénesis somática

La regeneración de plantas se puede realizar a través de dos vías morfogénéticas:

Organogénesis

Se lleva a cabo la formación de órganos hasta lograr el desarrollo completo de una planta, esta sistema morfogénéticos, se lleva de manera directa cuando la formación de regiones meristemáticas es directamente desde una célula del explante (segmento de tejido u órganos) o de manera indirecta cuando se da lugar a la formación de un callo, el cual es una masa amorfa de células no diferenciada, que posteriormente se diferencian y permiten el desarrollo de brotes adventicios que son individualizados y sujetos a un proceso de enraizamiento (Smith, 2006).

Embriogénesis somática

Es otra vía de regeneración, en la cual tiene lugar la formación de embriones a partir de células somáticas o sexuales sin que haya la fusión de gametos, ésta puede ser de dos tipos, la vía directa consiste en la formación de un embrión partiendo de células meristemáticas del explante que dan lugar a estructuras bipolar (embriones somáticos) que, cuando germina, da como resultado una planta completa. La forma indirecta requiere la formación previa de un callo y después la diferenciación, germinación y desarrollo de los embriones para dar lugar a una planta completa (Freire Seijo, 2003).

1.3. Biorreactores

Un biorreactor puede definirse como un recipiente que mantiene un ambiente biológicamente activo. En algunos artículos, se define un biorreactor como un recipiente en el que se lleva a cabo un proceso químico que involucra

organismos o sustancias bioquímicamente activas derivadas de dichos organismos (Ancheyta S. R., 2014).

Los biorreactores son comúnmente cilíndricos, variando en tamaño desde algunos mililitros hasta metros cúbicos. Proveen un ambiente óptimo para maximizar el rendimiento y la producción minimizando los costos de producción y los tiempos del proceso, asegurando el control de distintos parámetros tales como la temperatura, la concentración de nutrientes, el ambiente aséptico, etc. (Ancheyta S. R., 2014)

Los biorreactores son recipientes que contienen medio de cultivo líquido, en el cual se sumergen células o tejidos que son usados para la producción industrial de microorganismos, metabolitos vegetales y animales (Takayama y Akita, 1994), implica el control automático y monitoreo de las condiciones del cultivo para obtener altos rendimientos, incrementar la productividad y disminuir los costos.

1.3.1. Tipos de biorreactores

Los tipos de biorreactores se pueden clasificar según su sistema de agitación, o el proceso de inmersión (Ancheyta S. R., 2014).

Clasificación por el sistema de agitación

Los biorreactores de agitación mecánica, son aquellos dispositivos agitados por propelas o aspas, generalmente hechos de acero inoxidable; que se utilizan para el cultivo de bacterias; son los llamados fermentadores.

Los biorreactores neumáticos poseen un sistema de inyección de aire que puede ser de abajo hacia arriba formando pequeñas burbujas (contraflujo), o inyección radial, creando un vórtice. Por lo general, están fabricados de polímeros, fibras de vidrio, y en algunos casos de acero inoxidable (Albarrán, 2017).

Clasificación de acuerdo al sistema de inmersión

- Sistema de inmersión continua. Son aquellos donde el medio de cultivo está en contacto permanente con el material a propagar, por lo general son utilizados para el cultivo de células, y bacterias (Takayama y Akita, 1994), fabricados en polímeros, vidrio y acero inoxidable. Pueden ser agitados mediante sistemas neumáticos o mecánicos. Este tipo de biorreactores ha sido utilizado tradicionalmente en el proceso de fermentación de la industria cervecera, de vinos y producción de enzimas. En el caso de producción de plantas con este tipo de sistemas, en el año 1994 se logró obtener 10.000 vástagos de *Stevia rebaudiana* en biorreactores de 500 litros (Akita et al., 1994). Esta especie es muy importante para la producción de un edulcorante natural.
- Sistema de inmersión temporal, son recipientes con un diseño basado en la combinación de la aireación, el uso de medios de cultivo líquido y la automatización del proceso de micropropagación (Harris y Mason, 1983), su mecanismo se basa en proporcionar inmersión con un tiempo y frecuencia determinado que dependerá del cultivo que se propague.

La inmersión temporal sobre la micropropagación se presenta con la finalidad de aumentar las tasas de multiplicación de especies vegetales de interés agrícola, forestal y medicinal; de esta manera se obtiene un mayor número de plantas por recipiente, el reemplazo del medio de cultivo es sencillo y demanda poca mano de obra.

Dependiendo de la especie, el período de tiempo empleado para la regeneración de plantas utilizando biorreactores pueden ser relativamente corto y genera gran cantidad de plantas, lo cual influye drásticamente en la disminución de los costos de producción.

1.3.2. Componentes y construcción de los biorreactores de inmersión temporal

El diseño de un biorreactor es una tarea compleja que involucra el empleo de los conocimientos científicos y de ingeniería requeridos con el fin de desarrollar un sistema que permita llevar a cabo el crecimiento de tejidos vegetales. Para llevar a cabo esta tarea se debe tomar en cuenta una serie de criterios de diseño de los cuales varían para los diferentes tipos de tejidos en estudio, pero en general, en el diseño de un biorreactor, los controles biomecánicos y bioquímicos son esenciales en la creación de un ambiente fisiológico simulado para el crecimiento de células y tejidos (Ancheyta S. R., 2014).

El diseño de un biorreactor debe ser lo más sencillo posible, evitando elementos mecánicos inaccesibles, debe permitir el montaje y desmontaje rápido y eficiente de tal forma que los cultivos estén poco tiempo en contacto con el medio exterior y evitar la contaminación de las muestras.

La selección de los materiales es vital. Los materiales plásticos pueden ser empleados siempre y cuando no presenten degradación química o mecánica cuando son sometidos al proceso de esterilización. Generalmente la esterilización se efectúa por autoclave o inmersión en alcohol. Así mismo, también son requeridos materiales de naturaleza transparente para permitir el monitoreo constante del sistema de biorreactores (Ancheyta S. R., 2014).

La mayoría de los biorreactores de inmersión temporal están fabricados en polímeros o vidrio y son utilizados principalmente para la micropropagación *in vitro* de plantas.

Su agitación es neumática, aunque se pudiese agitar mecánicamente. Algunas de las variables a controlar en este tipo de biorreactores son la duración y frecuencia de la inmersión, el volumen del medio de cultivo y del recipiente, así como la frecuencia de cambio del medio de cultivo. Cuando trabajamos con cultivos *in vitro* debemos hacer subcultivos mensual o bimestralmente,

dependiendo del cultivo. Estos subcultivos se deben realizar para promover la propagación de crecimiento de las plantas.

Existen diseños que destacan en los sistemas de inmersión temporal, como BIT, RITA® y BIG (figura no. 6).

- Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT), consiste en dos recipientes: en uno se encuentra el medio de cultivo y en el otro tejido vegetal o la planta que está en crecimiento. Funciona con una bomba que permite el paso de aire a través del recipiente, donde se encuentra el medio de cultivo, la presión del aire empuja el medio hacia el otro recipiente donde están los explantes, obteniendo los nutrientes que necesita para crecer. Luego se corta el suministro de aire y otra bomba activa un mecanismo en este recipiente que hace que el medio de cultivo pase de nuevo al recipiente inicial y así se completa el ciclo de inmersión.
- Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA®), es el más comercial de los sistemas de inmersión temporal. En lugar de tener dos recipientes como los modelos anteriores, poseen un recipiente dividido en dos compartimientos. En el centro del compartimiento superior hay un tubo precedido de un filtro que impide el paso de bacterias y esporas de hongos, entrando a una presión específica de 0,2 bar, a través del cual se inyecta aire estéril por medio de un compresor que está conectado al equipo por mangueras, con el fin de desplazar el medio de cultivo desde el compartimiento inferior al compartimiento superior. El medio de cultivo controlado por un temporizador se mantiene en la parte superior sumergiendo el tejido por un tiempo determinado (tiempo de inmersión) y luego cuando se interrumpe la entrada de aire, el medio baja por gravedad al compartimiento inferior (Tirado & Naranjo, 2005).
- Biorreactor de inmersión por gravedad (BIG) consiste en dos recipientes: en uno se encuentra el medio de cultivo y en el otro tejido vegetal o la planta que está en crecimiento. A diferencia de los frascos gemelos, el sistema

BIG funciona con el uso de una sola válvula solenoide y el sistema se reporta con el uso de un compresor (Bello, et al, 2014).



Figura no. 6. Sistemas de Inmersión Temporal. A) Sistema BIT. B) Sistema RITA®. C) Sistema BIG (Bello, et al, 2014).

Una característica común en todos los biorreactores es que su velocidad de agitación deberá ser baja (menos de 150 revoluciones por minuto) y en flujo laminar constante (González, 2006), con el fin de no dañar el cultivo.

Para la instalación automatizada del sistema de inmersión temporal es importante el uso de un reloj temporizador digital que active y desactive en un tiempo específico y de manera independiente a través de una serie de electroválvulas, el aire proveniente de un compresor (Albarrán, 2017).

1.3.3. Uso de los biorreactores en la micropropagación in vitro

El uso de un biorreactor conduce al desarrollo de tecnología adecuada para la propagación de plantas a gran escala y por tanto el tamaño de los recipientes dependerá de la escala o volumen que se quiera producir. La construcción básica y las características de varios tipos de sistemas de biorreactores se revisan en relación con los cultivos de brotes y embriones.

El empleo de cultivo *in vitro* en biorreactores de inmersión temporal (RITA® y BIT), ofrece muchas ventajas en el proceso de escalamiento de la producción de especies de interés comercial, respecto a los sistemas de cultivo convencional (Alvarenga Venutolo & Salazar , 2015).

Los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) se han empleado para la multiplicación *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa spp.* Pérez, et al, 2012.

1.3.4. Micropropagación de agaves utilizando biorreactores

Se realizó una investigación sobre los proyectos reportados en micropropagación de agaves utilizando biorreactores BIT que se resume en el cuadro no. 2, con el fin de establecer el diseño para la implementación de biorreactores en los *agaves karwinskii*.

Cuadro no. 2. Condiciones probadas por diferentes autores para la micropropagación de agaves utilizando biorreactores BIT.

SISTEMA	ESPECIE	FRECUENCIA	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	CONDICIONES	CITA
BIT	<i>Agave durangensis</i> .	1 min cada 12 horas	7 días	50 ml de medio de cultivo por explante, se usaron 5 explantes por biorreactor, se realizaron 3 repeticiones.	(Durán, 2015)
BIT	<i>Agave tequilana Webervar. azul</i>	1 min cada 24 hrs	4 semanas	35 ml de medio de cultivo por explante, se usó 1 explante por biorreactor. Se evaluaron 16 tratamientos con 3 repeticiones cada una.	(Ramírez, 2015)
BIT	<i>Agave victoriae-reginae</i>	2 min cada 24 hrs	8 días	35 ml de medio de cultivo por explante, se usó 1 explante por biorreactor. Se evaluaron 16 tratamientos con 3 repeticiones cada una.	(Montejo Guzmán, 2016)

2.JUSTIFICACIÓN

La producción de mezcal, se enfrenta a la problemática de falta de materia prima (piñas de diferentes especies de Agaves mezcaleros) y la falta de variabilidad genética que se tiene en los individuos.

La elaboración de mezcal a partir del agave madre cuixe ha resultado altamente valorada en el mercado siendo su demanda cada vez mayor. La explotación de los agaves con la finalidad de producir bebidas alcohólicas ha hecho que se vean amenazadas las especies ya que no se cultivan muchos agaves para la obtención de semillas de diferentes plantas (CIATEJ, 2017).

El cultivo de tejidos vegetales resulta una alternativa importante, ya que permite la producción a gran escala de plantas libres de patógenos sin que se depreden los ejemplares en estado silvestre, además se puede contar con plantas en cualquier periodo del año, sin importar la estacionalidad. Por otro lado, se puede conservar la variabilidad genética a partir de cultivos *in vitro* derivados de semillas y, generar líneas genéticas para que sean introducidas y establecer poblaciones que provengan de diferentes semillas y que no todas sean el mismo clon.

Por ello se ha planteado como una alternativa la micropropagación del agave madre cuixe a través de semillas obtenidas por diferentes plantas, con el fin de mejorar las técnicas de producción de agave madre cuixe y solucionar el problema de falta de materia prima durante los procesos existentes de producción de mezcal.

Al utilizar el CTV se obtienen diferentes ventajas sobre los métodos convencionales como lo son: plantas libres de patógenos, bancos de germoplasma, obtención de nuevas variedades y mejoramiento genético, intercambio internacional de germoplasma, propagación vegetativa a gran escala y reducción en costos de producción.

Recientemente se ha establecido un sistema de micropropagación con el diseño de biorreactores de inmersión temporal, para cubrir la demanda de los sistemas de propagación tradicional que no satisfacen la demanda de los cultivos (Escalona Morgado, 2014)

De acuerdo con la Escalona Morgado la implementación de biorreactores en la clonación y micropropagación de agaves, puede reducir considerablemente los costos de producción, lograr tasas de multiplicación más altas que con las técnicas convencionales de cultivo de tejidos vegetales. La semi-automatización del proceso, permite una mayor facilidad a los explantes de toma de los nutrientes y, además reducir la manipulación en los subcultivos evitando la contaminación, asimismo se reduce las horas de trabajo disminuyendo los costos.

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Implementar el sistema de bioreactores para llevar a cabo el cultivo *in vitro* de *Agaves karwinskii* en condiciones asépticas y el aprovechamiento de su totipotencialidad.

3.2. Objetivos particulares

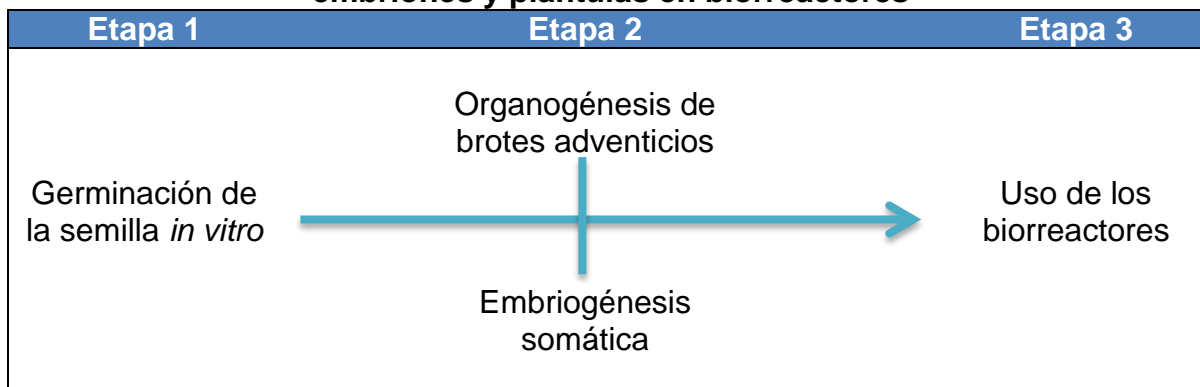
- Evaluar el método de desinfección de semillas.
- Evaluar diferentes medios de cultivo para la germinación de semillas de *A. karwinskii*.
- Evaluar y seleccionar diferentes medios de cultivo para la inducción, proliferación, desarrollo y germinación de embriones somáticos e inducción, desarrollo y enraizamiento de brotes adventicios de Agave madre cuixe.
- Diseñar y construir un biorreactor para la micropropagación.
- Probar y seleccionar diferentes condiciones de cultivo del biorreactor (tiempo y frecuencia de inmersión, tamaño del inóculo, densidad del inóculo, medio de cultivo) para la micropropagación del Agave madre cuixe.
- Evaluar el protocolo en cuanto a etapas, tiempo, rendimientos de la micropropagación del Agave mezcalero madre cuixe.

4. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de tejidos vegetales, del dpto. De Bioquímica, de la facultad de Química.

Para el cumplimiento de los objetivos, la parte experimental se llevó a cabo en diferentes etapas como se presenta en el cuadro no. 3.

Cuadro no. 3. Etapas de la parte experimental para la obtención de embriones y plántulas en biorreactores



4.1. Material biológico

Se utilizaron semillas de ejemplares silvestres de *Agave karwinskii*, colectadas en Santiago Matatlán, Oaxaca, en marzo de 2017 (Figura no. 7). Las semillas de cada planta se mantuvieron independientemente en frascos ámbar a 4° C.



Figura no. 7. Semillas de la planta 1 de Agave madrecoixte, colectadas en Santiago Matatlán.

4.2. Aspectos generales

4.2.1. Preparación de medios de cultivo

Los medios de cultivo se prepararon a partir de soluciones concentradas (100X) de los medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y N6 (Chu *et al*, 1975). Se utilizaron como compuestos orgánicos, vitaminas MS modificadas más glicina para los medio MS y para los medios N6 se adicionó una combinación de aminoácidos y vitaminas denominada coctel 20, además L-prolina y caseína hidrolizada. Todos los medios se suplementaron con 3 % de sacarosa como fuente de carbono y, según la etapa de cultivo se utilizaron diferentes reguladores de crecimiento como se especifica en la tabla no. 1. A todos los medios de cultivo se les ajustó el pH a 5.7 con NaOH o HCl 1N según fuera necesario. El agente gelificante utilizado fue agar TC a razón de 6 g.l⁻¹. Los medios se autoclavearon en una autoclave vertical a 120°C durante 18 minutos. En cada etapa se variaron las concentraciones y combinaciones de los reguladores de crecimiento como se describirá en la tabla no. 1.

Tabla no. 1. Sales y reguladores de crecimiento utilizados en los medios de cultivo en las diferentes etapas de la micropropagación.

Especie	Vía de regeneración	Sales del medio	Etapas			
			Germinación	Inducción	Proliferación	Regeneración /enraizamiento
<i>Agave karwinskii</i>	Organogénesis	MS	S/R; AG3	-----	BA / ANA	BA
	Embriogénesis	N6	2,4-D / BA	2,4-D / BA	BA	-----

4.2.2. Condiciones de incubación

Todos los cultivos de *Agave karwinskii* se mantuvieron en un cuarto de incubación bajo condiciones de fotoperiodo 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y a una temperatura en 25° C. Los cultivos se subcultivaron a medio fresco cada 3 semanas. En cada subcultivo se eliminó el tejido oxidado, los subcultivos se

realizaron pasando los callos a medios de la siguiente etapa, en frascos más grandes.

4.3. Método de desinfección de semillas

Las semillas se cosecharon de 5 plantas (P1, P2, P3, P4 y P5) y se almacenaron según las diferentes plantas. Las semillas se seleccionaron según su apariencia y condición fitosanitaria y se desinfectaron iniciando con un lavado con jabón y agua corriente durante 10 minutos fuera de la campana de flujo laminar.

Las semillas se llevaron a la campana de flujo laminar en donde se sumergieron en alcohol al 70% durante 1 min., posteriormente se pasaron a una solución de NaClO al 20% (v/v) durante 15 minutos. Se enjuagaron varias veces con agua desionizada estéril y finalmente se dejaron en antibióticos. Algunas semillas se dejaron en remojo de una solución con AG₃ (pretratamiento).

4.4. Germinación *in vitro*

Para obtener los explantes para la inducción y proliferación de embriones somáticos (embriogénesis somática) y brotes múltiples (organogénesis) fue necesaria la germinación *in vitro* de semillas del Agave madrecoixte.

Se desinfectó la semilla en condiciones asépticas (campana de flujo laminar) como se describió anteriormente y, posteriormente se sembraron en frascos de 7 cm probándose dos medios de cultivo (MS y N6i) bajo diferentes condiciones, con remojo y sin remojo con AG₃ para promover la germinación (figura no. 8).



Figura no. 8. Semillas de A. Madrecoixe en medio N6p de la planta 1.

Se realizaron tres siembras (lotes) en diferentes tiempos, en la tabla no. 2 se describen los medios y condiciones que se emplearon en cada lote.

Tabla no. 2. Medios de cultivos probados en diferentes lotes para la germinación de semillas.

No. Lote	Medio de cultivo	Remojo	Condición de incubación	Total de semillas sembradas				
Lote 1	# Planta			P4				
	N6i	Sin	Fotoperiodo	20				
		Sin	Oscuridad	20				
Lote 2	# Planta			P1	P2	P3	P4	P5
	MS	Con	Fotoperiodo	30	2	30	30	30
	N6i	Con	Fotoperiodo	30	2	30	30	30
Lote 3	MS	Con	Fotoperiodo	0	0	15	0	0
	N6i	Con	Fotoperiodo	15	0	0	0	0

4.5. Organogénesis *in vitro*

4.5.1. Etapa 1: Inducción de la organogénesis a través de brotes adventicios

Para la inducción de la organogénesis, se dejaron desarrollar las plántulas obtenidas de la germinación en los medios MS con remojo de AG₃ del lote 2 y se subcultivo a medio MS. Posteriormente se seleccionaron 10 semillas, dos de cada planta (P1, P3, P4 y P5) para probar 4 medios con diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento que se presentan en la tabla no. 3.

Tabla no. 3. Medios de cultivo para la inducción de brotes adventicios (organogénesis).

Compuesto	Medios de cultivo			
	T1	T2	T3	T4
Sorbitol	0	50 g.l ⁻¹	0	50 g.l ⁻¹
BA	2 mg.l ⁻¹	2 mg.l ⁻¹	3 mg.l ⁻¹	3 mg.l ⁻¹

Con base a los resultados obtenidos en la germinación del lote dos se sembraron las semillas de la planta 3 para el lote 3.

4.5.2. Etapa 2: Proliferación de los brotes adventicios

Los diferentes medios se identificaron como T1, T2, T3 y T4 para llevar acabo la proliferación de los brotes adventicios de *Agave karwinskii* en los siguientes subcultivos. En esta etapa se subcultivaron los brotes cada 3 semanas.

4.5.3. Etapa 3: Enraizamiento de brotes adventicios.

Después de varios subcultivos durante la proliferación de brotes, todos los brotes se pasaron a un medio con sales MS al 50% y con 10 mg.l⁻¹ de BA para la inducción de raíces de los agaves.

4.6. Embriogénesis somática

4.6.1. Etapa 1: Inducción de la embriogénesis somática

Para inducir la formación de callo embriogénico, las semillas se pusieron a germinar directamente en un medios que promoviera la embriogénesis, en el lote 1 sólo se sembraron semillas de la Planta 4 y en el medio N6i, en el lote 2 ya se utilizaron semillas de las plantas 1, 2, 3, 4 y 5 y se pusieron en medio N6i para estimular la germinación. Con base a los resultados obtenidos en la germinación del lote dos se sembraron las semillas de las plantas 1 para el lote 3.

4.6.2. Etapa 2: Proliferación de callos embriogénicos

Después de la formación incipiente de callo y germinación, todas las semillas del lote 2 que procedían del medio N6i se subcultivaron a tres medios diferentes para promover la proliferación del callo (Tabla no. 4).

Tabla no. 4. Medios de cultivo para la proliferación de callos embriogénicos.

Compuesto	Medios de cultivo		
	N6p	N6pm	N6pm1
2,4-D	2 mg	2.5 mg	3 mg
BA	0.1 mg	0.1 mg	0.1 mg

En el caso del lote 1, los cultivos no progresaron por lo cual no se siguieron subcultivando; en el caso del lote 3 todas las semillas se subcultivaron al medio N6p.

4.6.3. Etapa 3: Desarrollo y germinación de los embriones somáticos

Después de la proliferación de callos en los lotes 2 y 3, se establecieron medios para asegurar la germinación de los embriones somáticos. Se establecieron dos concentraciones de 2,4-D en cada uno de los medios de cultivo de la proliferación de callos, en una se redujo la concentración de 2,4-D al 50% (N6p G-1, N6pm G-1 y N6pm1 G-1), mientras que en la otra se eliminó por completo dicho regulador (N6p G-2, N6pm G-2 y N6pm1 G-2). Para cada medio de cultivo se tomaron al azar frascos con callo de cada planta para llevar a cabo la proliferación (tabla no. 5).

Tabla no. 5. Medios de cultivo para la germinación de los embriones somáticos.

Compuesto	Medios de cultivo					
	N6p-G1	N6p-G2	N6pm-G1	N6pm-G2	N6pm1-G1	N6pm1-G2
2,4-D	1 mg	-	1.25 mg	-	1.5 mg	-

4.7. Uso de los biorreactores.

Inicialmente se tuvieron dos propuestas. La primera propuesta se realizó observando las características y funcionamiento del biorreactor con el que se cuenta en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Para la segunda propuesta se realizó la investigación sobre diferentes tipos de biorreactores y sus características, así como los parámetros que se requieren para la propagación de cultivos en biorreactores. También se consideró el análisis de las etapas de la parte experimental para la obtención de embriones y plántulas en biorreactores y, se consideró que el biorreactor fuera de bajo costo y eficiente.

4.7.1. Construcción de los biorreactores

El biorreactor de la primera propuesta se armó varias veces para identificar el diseño y análisis de funcionamiento, y se planteó en la figura no. 9.

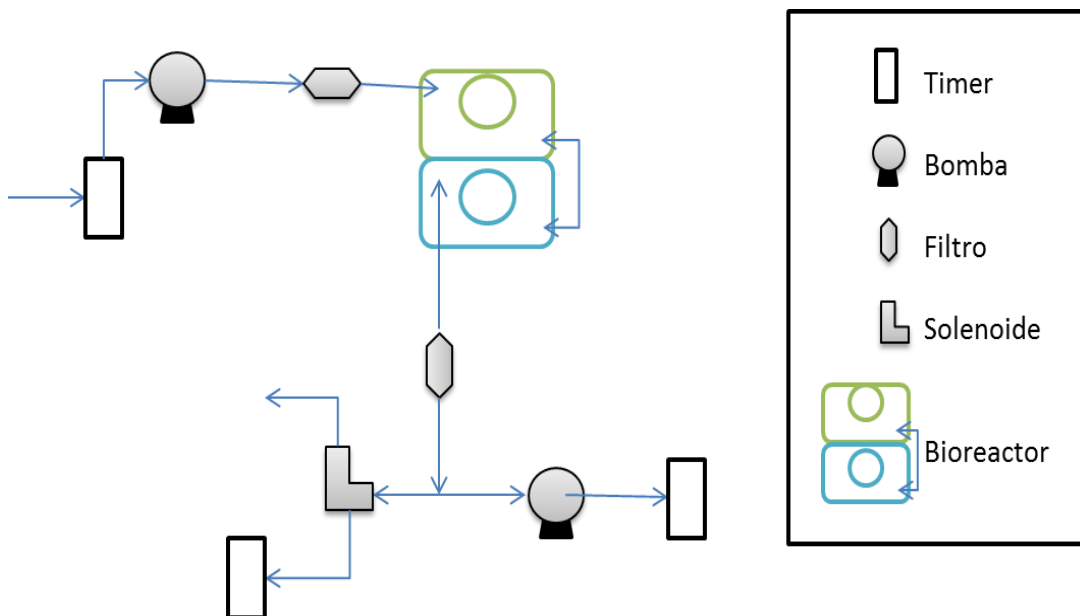


Figura no. 9. Esquema del sistema del biorreactor del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

Para el biorreactor de la segunda propuesta se estableció el diseño de prototipos de BIT, empleando frascos de vidrio de 1 L. de capacidad con tapas, empaques, mangueras y filtros hidrofóbicos de 0,22 μm , considerando todos los materiales del sistema autoclaveables.

En la figura no. 10 se presenta el sistema de la segunda propuesta, con dos bombas y un solenoide conectados a un timer para la automatización de los biorreactores.

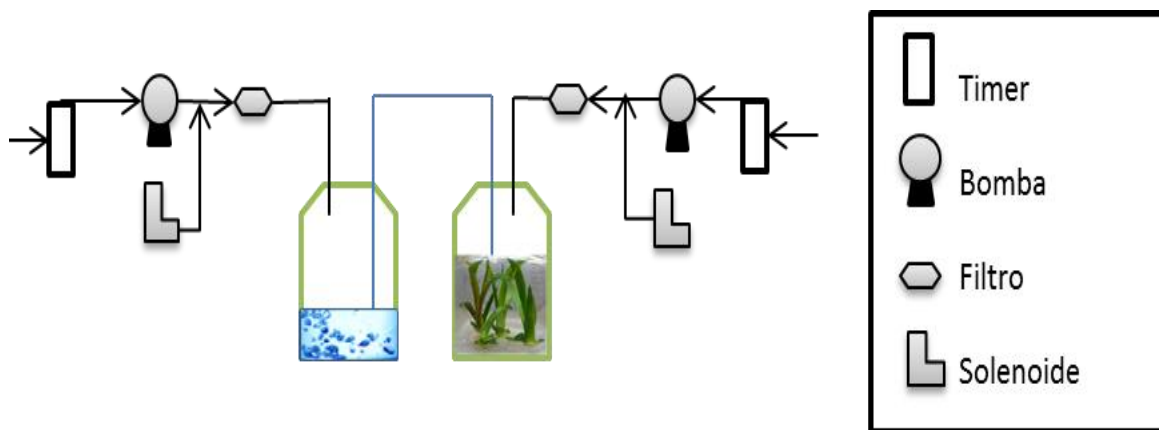


Figura no. 10. Esquema del sistema de biorreactor BIT. El primer contenedor con medio de cultivo y el segundo con brotes adventicios.

4.7.2. Inducción de la organogénesis a través del uso de los biorreactores

Para llevar a cabo la inducción de la organogénesis se estableció el sistema de los biorreactores de la segunda propuesta. Se construyó un sistema de inmersión temporal de frascos gemelos con base a la revisión de literatura empleando frascos de vidrio de 1 litro de capacidad con tapas, fittings, mangueras y filtros hidrofóbicos de 0,22 μm . Se consideraron todos los materiales del sistema de autoclaveables.

Se realizaron varias pruebas para el establecimiento de los biorreactores fuera de las condiciones *in vitro*, sin agaves y sin medio de cultivo.

Una vez que se lograron establecer los biorreactores se autoclavearon y se pusieron en marcha 4 tratamientos: tratamiento A, tratamiento B, tratamiento C y tratamiento D, a diferentes tiempos de inmersión y frecuencia como se estable en la tabla no. 6.

Para la multiplicación de los brotes se utilizaron 300 ml de medio de cultivo líquido T3 adicionando 40 g/L de sorbitol al medio. El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5.7 y se esterilizó en los frascos de vidrio de 1 l en autoclave por 18 min.

Tabla no. 6. Parámetros para el establecimiento de los tratamientos en los biorreactores.

Parámetros	Tratamientos			
	A	B	C	D
Modificaciones en el medio T3	Sin modificaciones	Sin agua de coco	Sin modificaciones	Sin modificaciones
Uso de antibiótico	Sin antibiótico	Con antibiótico	Con antibiótico	Con antibiótico
Tiempo de inmersión	2 min	2 min	5 min	5 min
Frecuencia	6 h	6 h	12 h	24 h

Se emplearon brotes como explantes previamente establecidos *in vitro* del medio sólido T3 ya que fue donde hubo mayor generación de brotes, los parámetros para el establecimiento de los biorreactores se presentan en la tabla no 7.

Tabla no. 7. Parámetros de los agaves *in vitro* para el establecimiento de los biorreactores.

Tratamiento	Repetición	Parámetros		
		No. Planta y semilla	No. Brotes iniciales	Tamaño de brotes inicial
A	1	P5, S7	6	11 cm (todos)
	2	P5, S7	6	11 cm (todos)
B	1	P5, S6	4	10 (2 indiv.), 9 y 7 cm
	2	P5, S6	6	2.5 a 3 cm (todos)
C	1	P5, S7	5	5, 6, 7.5 (2 indiv.), y 9 cm
	2	P5, S7	7	3 (3 indiv.) y 4 cm (4 indiv)
D	1	P5, S8	8	2 (4 indiv.), 3 (3 indiv.) y 7 cm
	2	P5, S8	4	8 (2 indiv.) y 9 cm (2 indiv.)

Para el tratamiento A se colocaron 6 explantes de 11 cm por biorreactor en un sistema de 2 biorreactores, todos los explantes fueron obtenidos de una misma semilla de la planta 5 en el mismo medio sólido T3 *in vitro*. El tratamiento se evaluó en un tiempo de inmersión de 2 min cada 6 horas

Se lavaron los biorreactores, las mangueras y los fittings. Se estableció un remojo con cloro al 100% por 24 horas y se esterilizó en autoclave por 18 min.

El tratamiento B se estableció con dos biorreactores, en uno se colocaron 4 explantes entre 10 y 7 cm en un biorreactor y en el otro se colocaron 6 explantes de tamaño entre 2.5 y 3 cm en un sistema de 2 biorreactores. Se utilizó un medio con antibiótico y los agaves fueron sometidos previamente en un tratamiento de desinfección con terbinafina 250 mg/L, PPM 2 ml/L, nistatina 100 mg/L + cefotaxima 2ml/L por 15 min y luego se realizaron enjuagues con agua desionizada estéril. Se evaluó en un tiempo de inmersión de 2 min cada 6 horas.

Para el tratamiento C se colocaron 5 explantes entre 5 y 9 cm en un biorreactor y en el otro se colocaron 7 explantes de tamaño entre 3 y 4 cm en un

sistema de 2 biorreactores, y se evaluó en un tiempo de inmersión de 5 min cada 12 horas.

Para el tratamiento D se colocaron 8 explantes de 2, 3 y 7 cm en un biorreactor y en el otro se colocaron 4 explantes de tamaño de 8 y 9 cm en un sistema de 2 biorreactores, y se evaluó en un tiempo de inmersión de 5 min cada 24 horas.

5.RESULTADOS

5.1.Desinfección de semilla

El método de desinfección utilizado fue eficiente ya que no se registró contaminación ni al principio ni después de la incubación de las semillas. Además a los medios de cultivo se les adicionó antibiótico y un antimicótico, lo que permitió que los cultivos estuvieran libres de patógenos. Durante los subsiguientes subcultivos, a los medios se les siguió incorporando antibiótico.

5.2.Germinación *in vitro*

Como se puede observar en la tabla no. 8, en el lote 1 hubo mayor porcentaje de germinación en condiciones de incubación en fotoperiodo que en oscuridad. Con ello se planteó el lote dos con cinco plantas diferentes en fotoperiodo y con remojo AG₃.

Tabla no. 8. Porcentaje de germinación de diferentes lotes de semilla de *A. karwinskii* sembrados en dos medios de cultivo.

No. Lote		1		2		3	
Medio de cultivo		N6i		MS	N6i	MS	N6i
Remojo		Sin remojo		AG3	AG3	AG3	AG3
Condición de incubación		Fotoperiodo	Oscuridad	Fotoperiodo	Fotoperiodo	Fotoperiodo	Fotoperiodo
No. De semillas sembradas	P1	-	-	30	30	-	15
	P2	-	-	2	2	-	-
	P3	-	-	30	30	15	-
	P4	20	20	30	30	-	-
	P5	-	-	30	30	-	-
No. De semillas germinadas	P1	-	-	20	22	-	10
	P2	-	-	1	0	-	-
	P3	-	-	14	11	7	-
	P4	20	3	13	7	-	-
	P5	-	-	23	23	-	-
Porcentaje de germinación	P1	-	-	67	73	-	73
	P2	-	-	50	0	-	-
	P3	-	-	47	37	47	-
	P4	35	15	43	23	-	-
	P5	-	-	74	77	-	-

En el lote 2 se observó que el porcentaje de germinación de las semillas fue bajo para las plantas 3 y 4, mientras que para las plantas 1 y 5 se registraron los porcentajes de germinación mayor al 50% tanto en el medio MS como en N6i. También se observó que el remojo con AG₃ estimuló la germinación aumentando el porcentaje en un 10 % más.

Para la planta 2 sólo se tenían 2 semillas por lo que no fue posible hacer otro lote. De la planta 5 tampoco se contó con más semillas para establecer otro lote. De acuerdo con ello y con el análisis del porcentaje de germinación, se estableció un tercer lote con 15 semillas de la planta 1 para el medio N6i y 15 semillas de la planta 3 para el medio MS. En el lote tres, las semillas de la planta 1 y 3 tuvieron el porcentaje de germinación mayor al 50 %.

En cuanto a la germinación y formación de callo en las semillas sembradas en el medio N6i del lote 3, 10 semillas se subcultivaron debido a que se observó la emisión de la hoja cotiledonaria, se observó que inmediatamente después de que se subcultivaron, 7 de las semillas dieron lugar a la formación de callo y 3 de ellas no lo hicieron (figura no. 11).



Figura no. 11. Germinación y formación de callo. A) Plántulas con formación de callo en la base en medio N6i. B) Plántula que no siguió su desarrollo.

Del lote tres se logró la germinación en medio MS+AG₃, 8 semillas se subcultivaron debido a que las hojas cotiledonarias emergieron. Se subcultivaron y 6 de las semillas siguieron el proceso de germinación pero 2 de ellas no lograron terminar el proceso de germinación, como se puede observar en la figura no. 12.

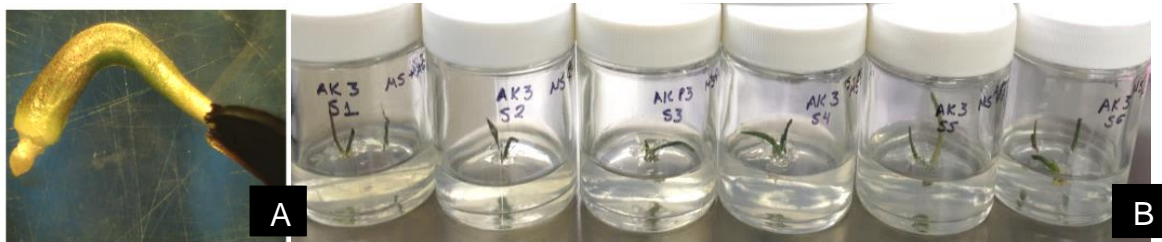


Figura no. 12. Germinación de semillas de *Agave karwinskii*. A) Fotografía tomada con microscopio estereoscópico de una semilla germinada en medio MS y en fotoperiodo. B) Semillas del lote 3 en medio MS después de 3 semanas de germinación.

Las plántulas obtenidas en el lote 2 se subcultivaron a un medio MS sin reguladores de crecimiento con la finalidad de que se desarrollaran y con ello lograr tener suficiente tejido que se pudiera utilizar como explantes para inducir la organogénesis. En la figura no. 13 se observa plantas obtenidas en medio MS + AG₃ del lote 2, que se utilizaron en el ensayo para organogénesis.

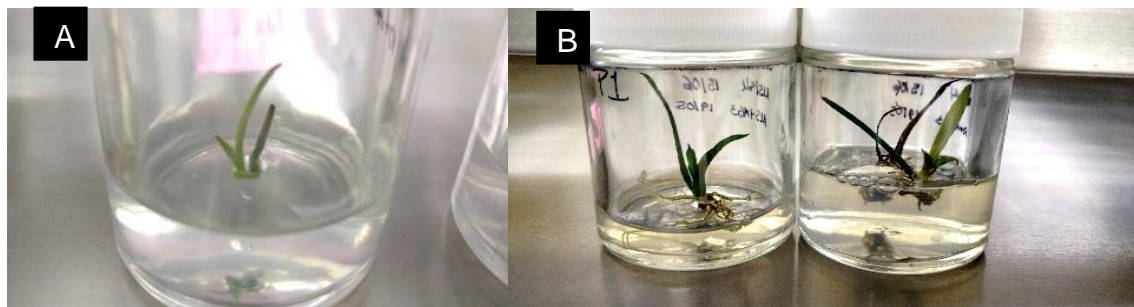


Figura no. 13. Plantas obtenidas por germinación de semilla. A) Planta obtenida a las 3 semanas de incubación del lote 2. B) Plantas en desarrollo del lote 2.

5.3. Organogénesis *in vitro*

5.3.1. Etapa 1: Inducción de la organogénesis a través de brotes adventicios

A) Lote 2

Para llevar a cabo la inducción de la organogénesis se elaboró la tabla no. 9 que presenta el número de plantas completas que se obtuvieron del lote 2. De las semillas sembradas de cada planta (P1, P3, P4 y P5) se seleccionaron 2 plantas

completas obtenidas de semillas diferentes para establecer los ensayos en los medios T1, T2, T3 y T4. Así cada medio tendrá un total de 8 semillas diferentes.

Tabla no. 9. No. de plantas obtenidas del segundo subcultivo en MS sin reguladores de crecimiento del lote 2, de diferentes plantas.

No. De planta	No. de semillas sembradas	No. de plantas completas	Porcentaje de germinación	No. De semillas seleccionadas
P1	30	16	53.3	2
P3	30	8	26.6	2
P4	30	4	13.3	2
P5	31	8	25.08	2

En los resultados del primer subcultivo en los 4 medios T1, T2, T3 y T4, se observó mayor crecimiento en comparación con el medio MS, así como la generación de brotes y en algunos casos del medio T2 y T4 la generación de callo (tabla no.10). En la planta 1 del T1 se presentó un mayor crecimiento en el agave por lo cual se puso a prueba la organogénesis indirecta de tal forma que se realizaron cortes en forma de disco transversal. Se disectaron en dos discos (zona apical y zona basal) para estimular la zona meristemáticas y generar brotes adventicios.

Tabla no. 10. Número de brotes totales de dos semillas por planta cultivados en los medios T1, T2, T3 y T4 hasta el segundo subcultivo.

Planta	Medio				
	Posición del disco	T1	T2	T3	T4
		No. De brotes	No. De brotes	No. De brotes	No. De brotes
1	Apical	2	1	2	0
	Basal	6			2 ¹
3	Apical	2	1	3	0 ¹
	Basal				
4	Apical	2	0	0	1
	Basal		1 / 0 ¹	1	
5	Apical	2	0 / 1 ¹	4	1 ¹ / 0 ¹
	Basal				

¹ No. de explantes con callo (1¹ que se ha obtenido un brote con callo, 0¹ que solo hubo formación de callo y no de brotes).

5.3.2. Etapa 2: proliferación de brotes adventicios

En el segundo subcultivo en los medios T1, T2, T3 y T4, a los agaves que tenían presencia de raíces y hojas se les eliminó para la evaluación de la inducción de los 4 tratamientos.

En la figura no. 14 se puede observar la comparación de tamaño de un *Agave karwinskii* después de 3 semanas del primer subcultivo en medio T1 con un agave del mismo lote 2, pero que se había subcultivado en medio MS sin reguladores de crecimiento.



Figura No. 14. Comparación del tamaño de 2 agaves en medios diferentes. El agave de mayor tamaño se encuentra en medio T1 mientras que el otro se encuentra en medio MS.

En la figura no. 15 se muestra uno de los agaves a los que se les hizo un corte después de dos subcultivos en medio T4. Se puede observar que presenta formación de callo y tiene un brote lateral.



Figura no. 15. *Agave karwinskii* en medio T4 en el segundo subcultivo.

En la figura no. 16 se puede observar el mismo agave después de tres semanas. Como en el caso de este agave en el medio T4, las respuestas a los 4

tratamientos fueron mejor de lo esperado ya que como en este caso, algunos agaves produjeron callo fiable.

En los agaves donde se dividió zona apical y basal, se observó que de la zona basal desarrolló una nueva planta, situación que no se presentó en la zona apical por lo que no se realizaron más cortes. Las figuras 15 y 16 muestran la sección del corte realizado en las plantas con una línea naranja en la parte izquierda donde se realizó el corte.

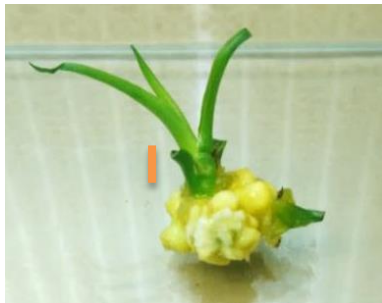


Figura no. 16. *Agave karwinskii* en medio T4 en el tercer subcultivo.

Después de cuatro subcultivos en los 4 medios, algunos agaves presentaron raíces de nuevo mientras que otros produjeron varios brotes adventicios como se ve en las figuras no. 17 y 18.

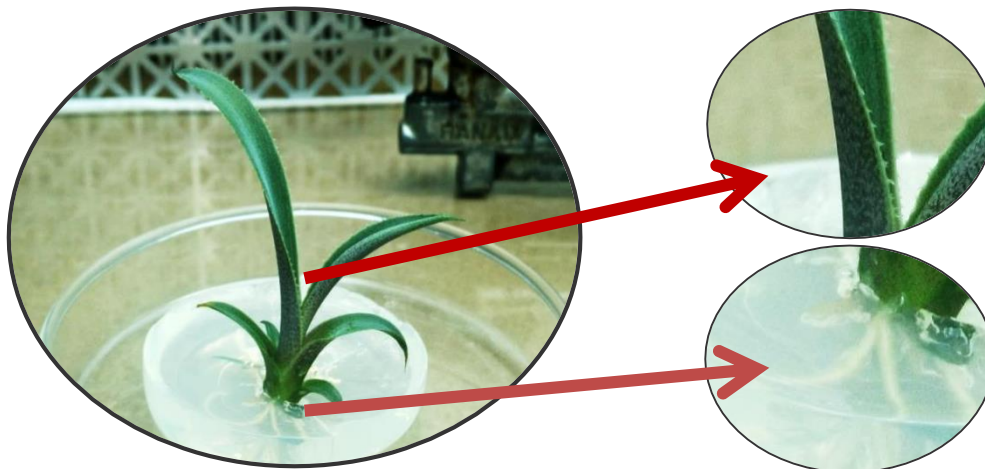


Figura no. 17. *Agave Karwinskii* en medio T1 en el cuarto subcultivo. El agave presenta la formación de raíces, así como de espinas en las hojas, pero no la producción de brotes o de callo.



Figura no. 18. *Agave karwinskii* en medio T3 en el cuarto subcultivo. Producción de varios brotes adventicios de una semilla, sin callo y sin raíz.

En la tabla no. 11 se presentan los resultados de las 8 semillas (2 semillas por plantas) de los 4 tratamientos después del 5° subcultivo.

Tabla no. 11. Número de semillas con callo y número de brotes de dos semillas por planta cultivados en los medios T1, T2, T3 y T4.

Medio		T1	T2	T3	T4
Planta 1	No. De brotes	7	1	8	2
	No de semillas con callo	2	0	2	2
Planta 3	No. De brotes	4	1	3	1
	No de frascos con callo	2	2	1	2
Planta 4	No. De brotes	2	1	3	0
	No de frascos con callo	0	0	1	2
Planta 5	No. De brotes	10	1	20	4
	No de frascos con callo	2	2	1	1
No. De brotes totales		23	4	34	7
No de frascos con callo totales		6	4	5	7

En todos los medios se han tenido semillas que producen callo pero no en todas las plantas, como las semillas de la planta 4 no produjeron callo en el T1 y T2. En el medio T3 se tiene un mayor número de brotes en total y en el T4 mayor número de semillas que producen callo. El callo que se produjo en los 4 medio como se ve en la figura no. 21, se pasó a medio N6p para seguir subcultivándolo.

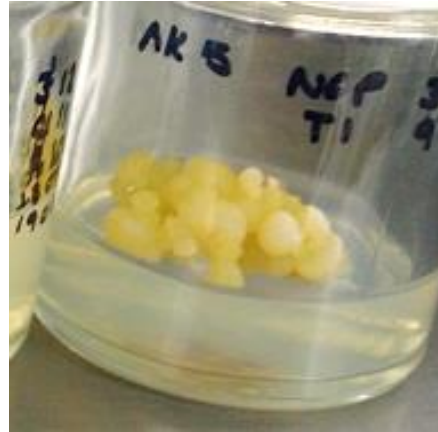


Figura no. 19. Callo de la planta 5 en medio T1, subcultivado a medio N6p.

Después de dos subcultivos del callo se vio la presencia de embriones en algunos casos como en la planta 1 en medio T4 (figura no. 20).

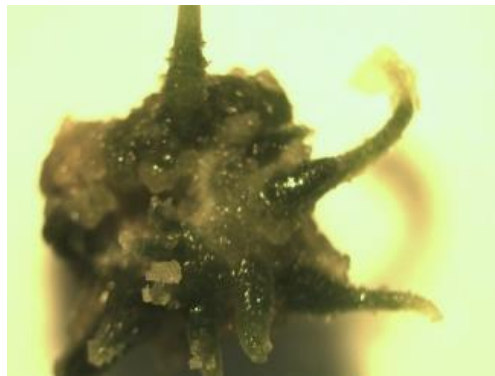


Figura no. 20. Fotografía tomada con microscopio estereoscópico al callo embriogénico de *Agave karwinskii* de la planta 1 en medio T4, subcultivado a medio N6p.

El crecimiento de los agaves en los 4 tratamientos se observó durante 4 meses y en la figura no. 21 se muestra una gráfica con el No. De brotes individualizados a partir de las 8 semillas en cada tratamiento.

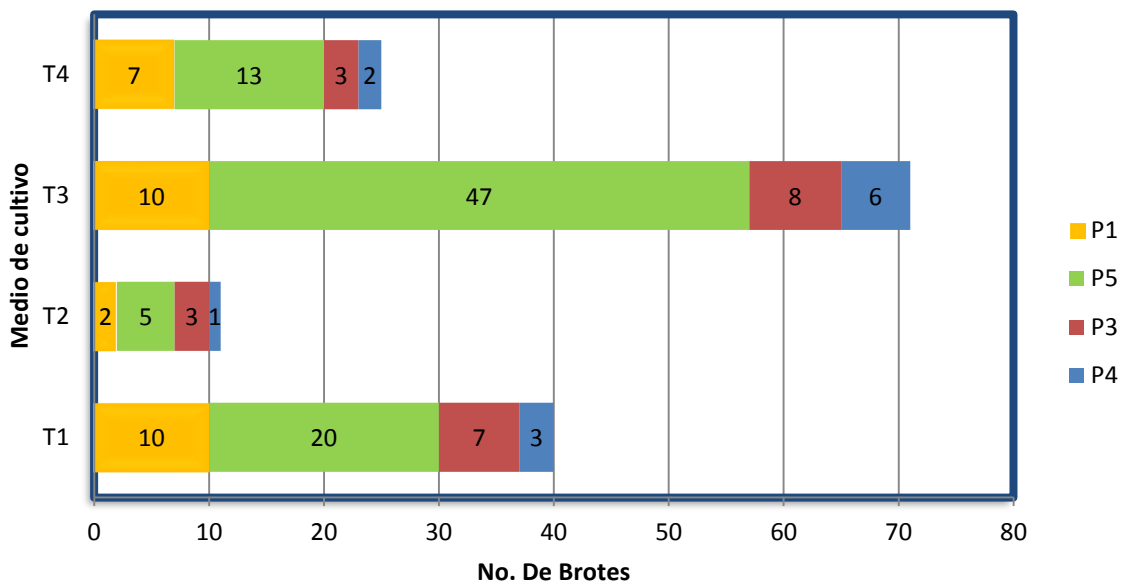


Figura no. 21. Número de brotes en los medios T1, T2, T3, T4 después de varios subcultivos.

Algunos de los brotes individualizados se pasaron al medio de regeneración con sales MS y se formaron raíces para así obtener la planta completa.

Las semillas 6, 7 y 8 fueron las semillas con mayor número de formación de brotes, por lo que se utilizaron para el establecimiento de los biorreactores.

B) Lote 3

Con respecto a la organogénesis del lote 3, se dejó crecer las plantas obtenidas en los medios MS con remojo, subcultivándose a medio MS sin reguladores de crecimiento con la finalidad de desarrollar más la planta. En la figura no. 22 se muestra el crecimiento de los agaves del lote 3. Los agaves en los frascos del 2° subcultivo son más pequeños que los del 3° subcultivo, pero los del 3° son del mismo tamaño que los del séptimo.

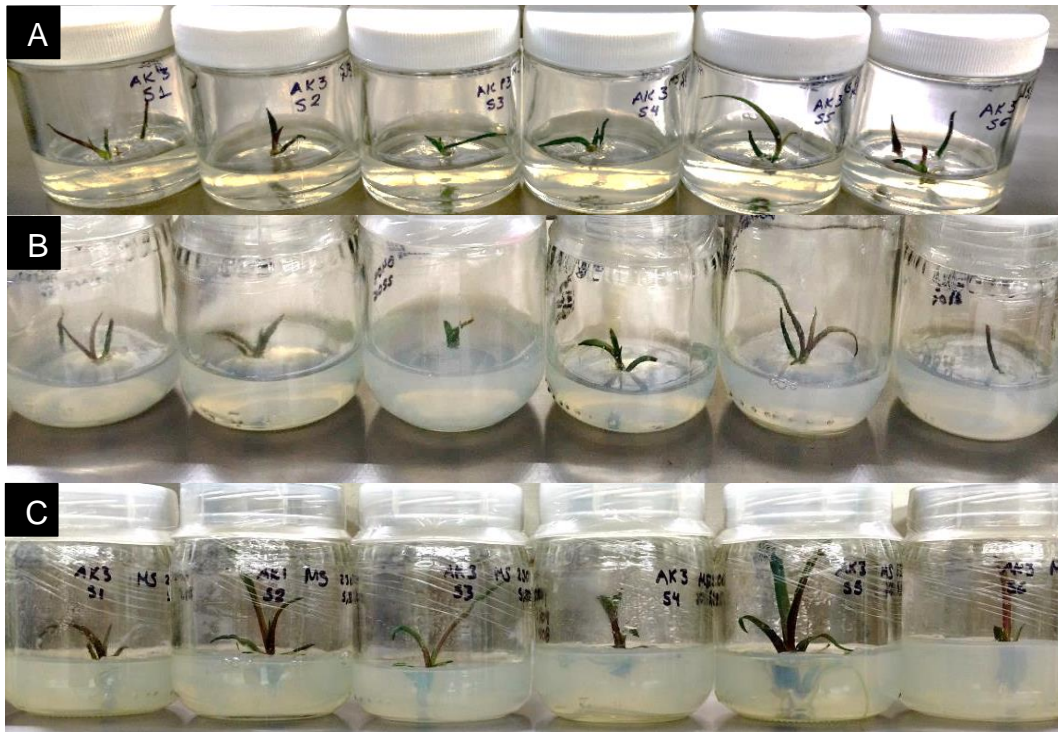


Figura no. 22. Plantas obtenidas del lote 3 en medio MS: A) Segundo subcultivo a medio MS. B) 3° subcultivo en medio MS. C) 7° subcultivo en medio MS.

A diferencia con los medios T1, T2, T3 y T4 con auxinas y citocininas, el medio MS no produjo brotes o formación de callo en los agaves.

5.3.3. Etapa 3: enraizamiento de brotes adventicios

En la tabla no. 12 se hizo un análisis por tamaño de los brotes en cada tratamiento, donde se observó que los agaves de mayor tamaño se encuentran en el medio T3.

Tabla no. 12. Clasificación del tamaño de los brotes individualizados en los medios T1, T2, T3 y T4.

Medio	No. De brotes		
	menos de 9 cm	entre 9 y 11 cm	más de 11 cm
T1	6	22	12
T2	10	1	0
T3	35	19	17
T4	17	7	1

Los brotes individualizados que presentaron un tamaño mayor a 11 cm se subcultivaron en un medio con sales MS al 50% y sin reguladores de crecimiento, para la estimulación del crecimiento de raíz. A excepción de los agaves de las semillas 6 y 7 en el T3 que no se pasaron al medio de enraizamiento ya que por tener mayor número de brotes se usaron para los ensayos en los biorreactores.

En la figura no. 23 se muestran agaves provenientes de diferentes semillas en el medio T3 en frascos de 1 litro.

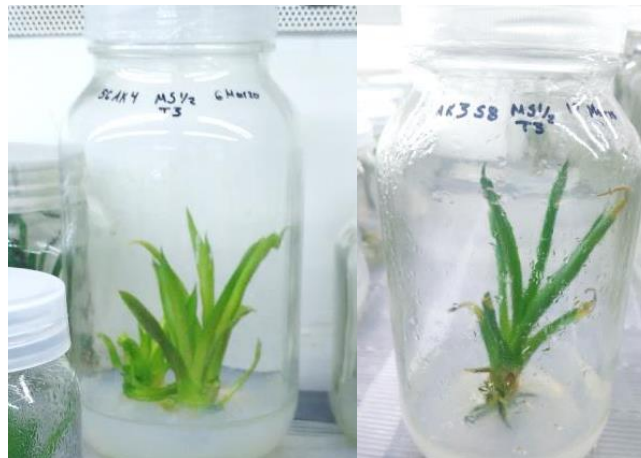


Figura no. 23. Brotes individualizados en medio MS al 50% provenientes del medio T3. A) Brote de la semilla 2 de la P1. B) Brote de la semilla 8 de la P3.

Lote 3)

Los agaves del lote 3 se pusieron directamente en un medio MS al 50% para llevar a cabo el enraizamiento, en la figura no. 24 se observan los agaves. Los agaves tuvieron presencia de raíces después del primer subcultivo en dicho medio.



Figura no. 24. Agaves del lote 3 de diferentes semillas en medio MS al 50%.

5.4. Embriogénesis somática

5.4.1. Etapa 1: Inducción de la embriogénesis somática

A) Lote 1

Todos los callos obtenidos del lote 1 no progresaron, debido a que se presentó una oxidación y el tejido fue muriéndose poco a poco.

B) Lote 2

En esta etapa las células del callo inicial comenzaron a dividirse rápidamente presentando un crecimiento considerable por lo que se buscó la proliferación del mismo.

Después de 4 subcultivos en medio N6p, del callo embriogénico del lote 2, se seleccionaron 5 frascos a los cuales se les eliminó el antibiótico, sin embargo después de 3 semanas se revisaron y de los 5 frascos se contaminaron 4, por lo que se decidió seguir manejando los subcultivos en medios con antibiótico y en la campana de flujo laminar.

5.4.2. Etapa 2: Proliferación de callos embriogénicos

B) Lote 2

En la figura no. 25 se observa el crecimiento del callo, destacando pequeños agregados que posiblemente son proembriones somáticos.

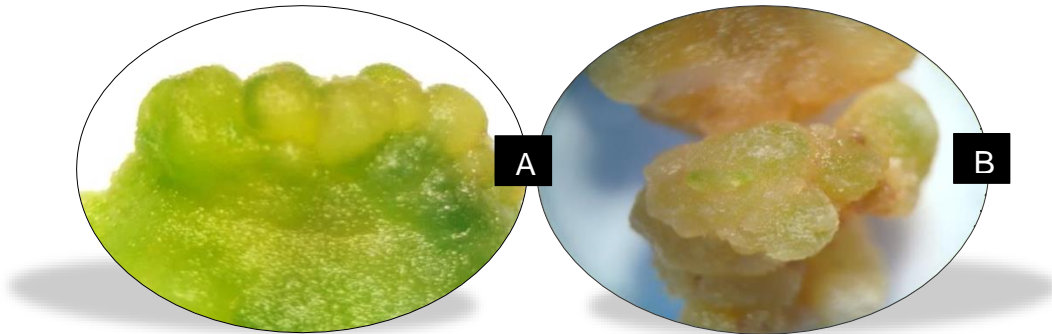


Figura no. 25. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico a los 4 subcultivos. A Proliferación de callo en medio N6p de la planta 1. B proliferación del callo en medio N6p de la planta 3.

Los callos obtenidos del lote 2 en el medio N6p se pasaron a tres diferentes medios denominados N6p, N6pm, N6pm1 para los siguientes subcultivos, en los que se probaron distintas cantidades de 2,4-D con la finalidad de obtener embriones somáticos para llevar a cabo los ensayos de la proliferación en el o los biorreactores.

En la figura no. 26 se puede observar callo de la planta 3 perteneciente al lote 2 el cual se subcultivó tres veces en medio N6p, lográndose el aumento en masa celular del mismo.



Figura no. 26. Callo de la planta 3 subcultivado por tercera vez en medio N6p.

Como resultado, el aumento de masa de células del agave madrecoixte en los tres medios se puede observar en la tabla no. 13 donde se presentan la

cantidad de frascos con callo después de tres subcultivos en cada uno de los medios propuestos.

Tabla no. 13. Número de frascos con callo de *A. karwinskii* sembrados en tres medios de cultivo del lote 2.

No. Planta	Medio de cultivo	No. De frascos con callos 1° subcultivo	No. De frascos con callo después del 2° subcultivo	No. De frascos con callo después del 3° subcultivo
1	N6p	30	51	45
	N6pm	34	24	40
	N6pm1	47	46	38
3	N6p	25	18	24
	N6pm	11	11	10
	N6pm1	10	7	15
4	N6p	7	6	3
	N6pm	1	4	6
	N6pm1	3	1	0

De las 63 semillas germinadas de la etapa 1 del lote 2, se removieron algunas masas de callo oxidado, y aun así se logró tener en el medio N6p 123 frascos, en N6pm se tuvieron 56 y en N6pm1 se tuvieron 53. Es decir, un total de 232 frascos con callo de apariencia sana para el cuarto subcultivo.

Se eliminaron los tejidos oxidados y se logró un incremento en la cantidad de callo cuando se aumentó la concentración de 2,4-D. El 2,4-D por ser una auxina estimuló la proliferación de los callos del lote 2 de forma eficiente en los tres medios. En la figura no. 27 se pueden observar callos provenientes de la planta 1 después de 3 subcultivos en los medios N6p, N6pm y N6pm1.



Figura no. 27. Callo (P1) después de 3 subcultivos. A) Proliferación de callo en medio N6p. B) Proliferación del callo en medio N6pm. C) Proliferación del callo en medio N6pm1.

Durante los siguientes subcultivos en los medios N6p, N6pm y N6pm1 se eliminó todo el tejido oxidado, subcultivando sólo el callo friable de apariencia sana.

Curvas de crecimiento de callo

La proliferación de los callos en los tres medios de cultivo (N6p, N6pm y N6pm1) se evaluó a través de cinéticas de crecimiento de peso fresco, para lo cual se tomaron 0.5 g de callo procedente de los 3 medios de cultivo y se subcultivaron a medio fresco. Se realizaron 7 repeticiones en cada uno de los 3 medios. Se pesó el callo de cada repetición cada dos días durante 3 semanas. Las curvas de crecimiento se presentan en la figura no. 30.

Como se puede observar en la figura no. 28, en los tres medios de cultivo, los callos crecen sin que se observe diferencias significativas entre ellos, el crecimiento es constante sin que se observe una disminución gradual del mismo. Después de la 3° semana el callo sigue proliferando, sin que se observe la etapa de desaceleración. En los medios N6p y N6pm se tiene un comportamiento similar, mientras que en el N6pm1 se tiene menor aumento de peso fresco en la 3° semana, sin embargo su comportamiento demuestra que el callo sigue proliferando.

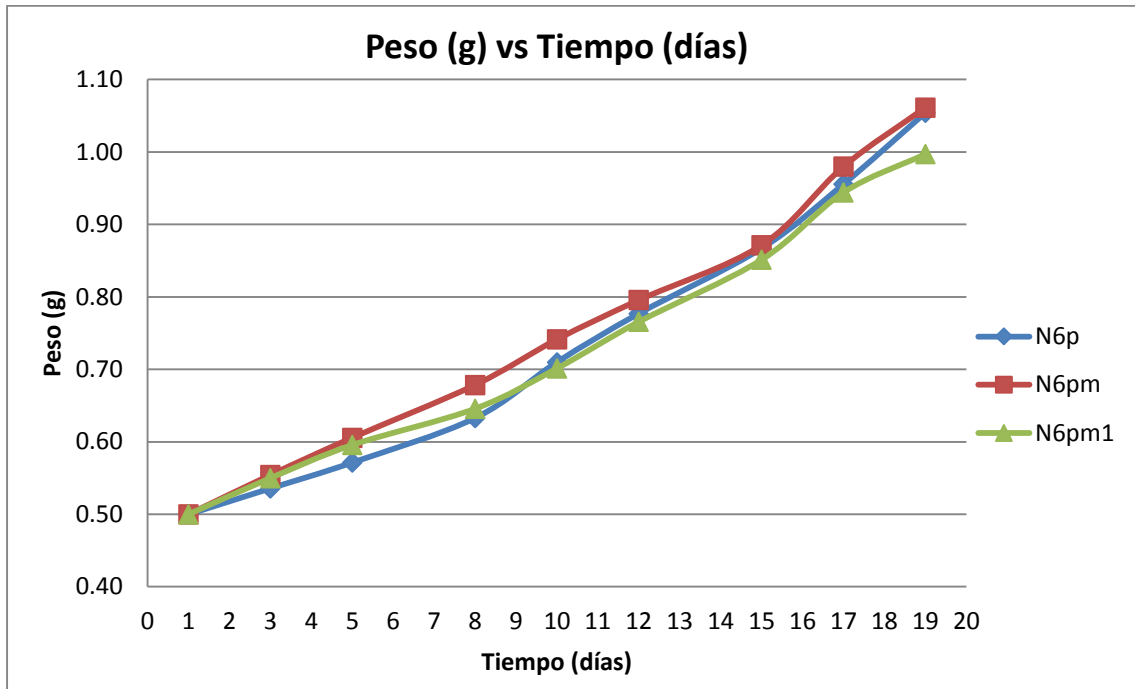


Figura no. 28. Cinética de crecimiento de callo *A. karwinskii* en los medios N6p, N6pm y N6pm1.

Con la cinética de crecimiento ya finalizada se decidió seguir subcultivando el callo embriogénico fiable del lote 2 en los tres medios N6p, N6pm y N6pm1 (figura no. 29).

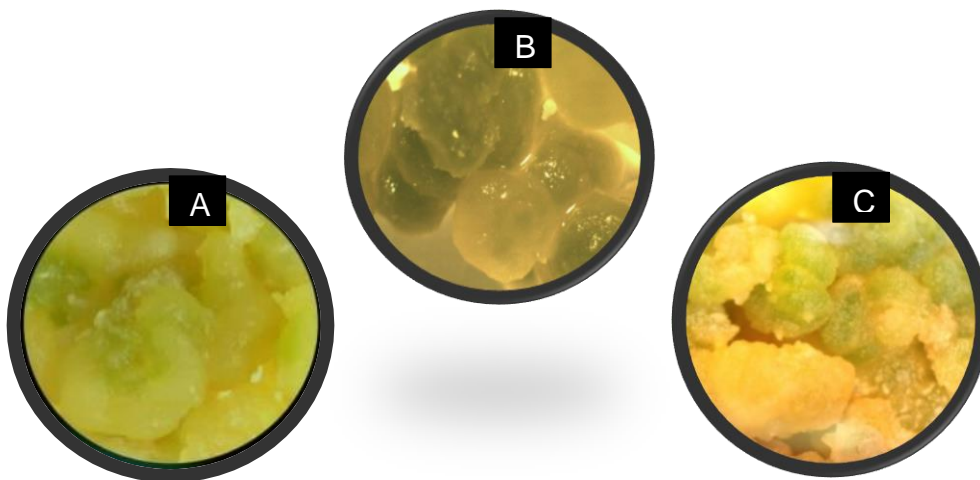


Figura no. 29. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico a los 7 subcultivos de la proliferación de callo: A) En medio N6pm1 de la planta 1. B) En medio N6p de la planta 3. C) En medio N6pm de la planta 1.

En la tabla no. 14 se muestra la cantidad de frascos con callos fiables y saludables, sin presencia de tejido oxidado, hasta el séptimo subcultivo.

Tabla no. 14. Número de frascos con callo de *A. karwinskii* sembrados en tres medios de cultivo del lote 2, 7° subcultivo.

No. Planta	Medio de cultivo	No. de frascos con callos 7° subcultivo
1	N6p	19
	N6pm	16
	N6pm1	18
3	N6p	25
	N6pm	10
	N6pm1	17
4	N6p	1
	N6pm	3
	N6pm1	0

En el séptimo subcultivo los callos embriogénicos presentaron puntos regenerativos (figura no. 30), los cuales se distinguieron por la diferenciación de cloroplastos, tornándose verde en la superficie de los mismos. Esta coloración indicaba la posible germinación de los embriones somáticos.

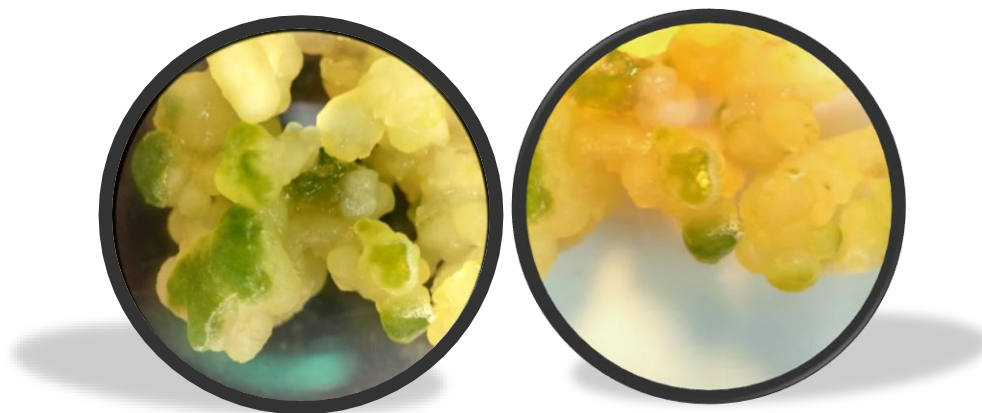


Figura no. 30. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico a los 7 subcultivos de la proliferación de callo en medio N6pm1 de la planta 3.

5.4.3. Etapa3: Desarrollo y germinación de embriones

Para asegurar la germinación de los embriones, en el octavo subcultivo se probaron dos concentraciones de 2,4-D en cada uno de los medios de cultivo, en una se redujo la concentración de 2,4-D al 50% (N6p G-1, N6pm G-1 y N6pm1 G-1), mientras que en la otra se eliminó por completo dicho regulador (N6p G-2, N6pm G-2 y N6pm1 G-2). Para cada medio de cultivo se tomaron al azar 5 frascos de cada planta, a excepción del medio N6pm donde no se contaba con el callo suficiente de la planta 3 como se observa en la tabla no. 15.

Tabla no. 15. Número de frascos con callo de *A. karwinskii* sembrados en tres medios de cultivo del lote 2, 8° subcultivo.

Medio	No. Frascos con callos		Frascos con formación de brotes después del 1° subcultivo	
	AK1	AK3	AK1	AK3
N6p-G1	5	5	0	0
N6p-G2	5	5	2	4
N6pm-G1	5	-	0	-
N6pm-G2	5	-	3	-
N6pm1-G1	5	5	0	0
N6pm1-G2	5	5	3	5
Total	30	20	29	20

En casi todos los medios sin 2,4-D se presentó la formación de brotes después del primer subcultivo, a diferencia de los medios donde se redujo al 50%. En la figura no. 31 se muestra la formación de algunos brotes.

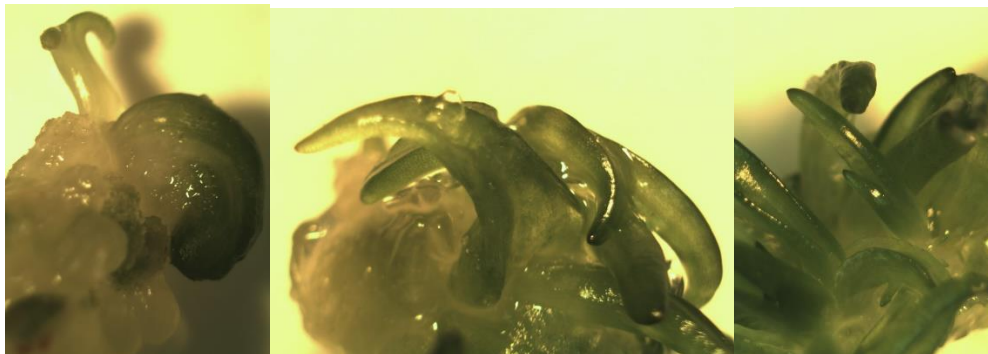


Figura no. 31. Fotografías tomadas con microscopio estereoscópico. Callo con brotes proveniente del medio N6pm1-G2 después del 1° subcultivo.

En el subcultivo 10 se ha observado un cambio muy significativo con respecto a la obtención de brotes en medio sin 2,4-D, figura no. 32.



Figura no. 32. El primer frasco a la izquierda es callo en medio N6p-G2, el segundo frasco es callo en medio N6p-G1. Ambos frascos subcultivados por décima vez.

En cuanto a los tres medios sin 2,4-D (medios G2), se observó que el medio N6pm1-G2 generó brotes más definidos en comparación con los otros dos medios. En la figura no. 33 se observa el comportamiento del callo en los medios N6pm1-G1 y N6pm1-G2.



Figura no. 33. El primer frasco a la izquierda es callo en medio N6pm1-G2, el segundo frasco es callo en medio N6pm1-G1. Ambos frascos subcultivados por décima vez.

Los demás frascos con callo del lote 2 se volvieron a subcultivar en sus respectivos medios N6p, N6pm y N6pm1 (Tabla no. 16). Estos callos no desarrollaron brotes en los siguientes subcultivos.

Tabla no. 16. Número de frascos con callo de *A. karwinskii* sembrados en tres medios de cultivo del lote 2, 9° subcultivo.

No. Planta	Medio de cultivo	No. De frascos con callos 9° subcultivo
1	N6p	6
	N6pm	6
	N6pm1	6
3	N6p	14
	N6pm	8
	N6pm1	8
4	N6p	2

Después de varios subcultivos se tuvo una diferencia aún más visible en casi todos los callos de la respuesta de los medios G2 con respecto a los callos de los medio G1, como se observa en la Figura no. 34.



Figura no. 34. Los primeros dos frascos a la izquierda están en medio N6p-G2, los dos frascos a la derecha están en medio N6p-G1.

C) Lote 3

El lote 3 se formó a partir de 15 semillas en medio N6i, de las cuales germinaron 10 y se pasaron al medio N6p, con la finalidad de esperar los resultados del lote 2 y poder elegir el mejor medio para llevar a cabo los subcultivos de los callos de este lote.

En este lote se observó que hay diferencias entre semillas puesto que unas semillas proliferaron más que otras, a pesar de provenir de la misma planta.

En la tabla no. 17 se puede observar la proliferación del callo a través del aumento de frascos por cada semilla durante 5 subcultivos en N6p. Como se observa, las semillas 1 y 8 no produjeron callo en ningún subcultivo a diferencia de la 4 y 10 que en el primer subcultivo sólo estaba presente la hoja cotiledonaria y después comenzaron a producir callo, mientras que la semilla 9 y 2 produjeron un callo prolífero del cual se lograron obtener hasta 8 frascos para la semilla 9 y 6 frascos para la semilla 2.

Tabla no. 17. No. De frascos con callo de *A. karwinskii* sembrados en medio N6p por semilla obtenidos en diferentes subcultivos lote 3.

Medio	Subcultivo						
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°
N6P	No. De frascos	No. De frascos	No. De frascos	No. De frascos	No. De frascos	No. De frascos	No. De frascos
Semilla	No. De frascos	No. De frascos	No. De frascos	No. De frascos	No. De frascos	No. De frascos	No. De frascos
1	0	0	0	0	0	0	0
2	1	1	1	4	6	2	2
4	1	2	2	2	3	1	0
7	2	2	3	3	3	2	3
8	0	0	0	0	0	x	0
9	3	4	4	7	8	3	9
10	1	1	1	1	3	2	2

En la figura no. 35 se observa los frascos obtenidos en este lote y se puede ver que la respuesta a través de los subcultivos es diferente en cada semilla, lo que demuestra que todas las semillas son genéticamente diferentes y su grado de madurez también puede influir en la respuesta morfogénica.

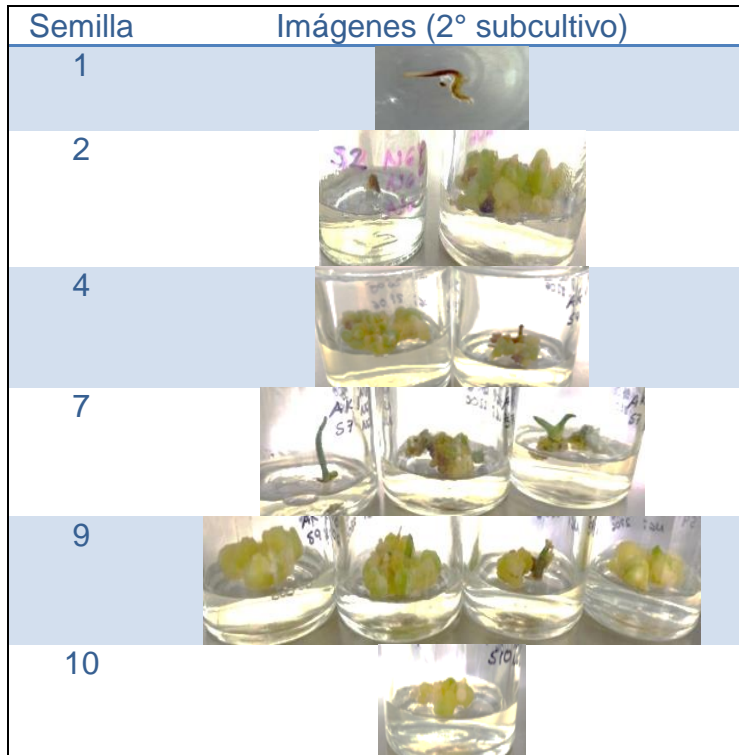


Figura no. 35. Obtención de callos embriogénicos de diferentes semillas de la planta 1, al segundo subcultivo. Los cultivos provenientes de las semillas 3, 5, 6 y 8 no proliferaron los callos.

Se observó periódicamente la respuesta morfológica de cada semilla. En la figura no. 36 se puede observar la proliferación de callos por semilla de la planta 1 de *A. karwinskii* hasta el 7° subcultivo.

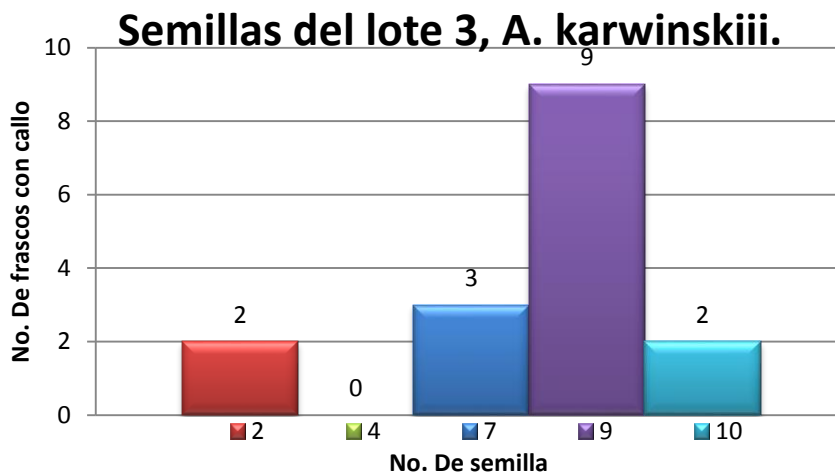


Figura no. 36. No. de frascos con callos embriogénicos de diferentes semillas de la planta 1.

La disminución registrada con respecto al número de frascos se debió a la presencia de una contaminación en los frascos que se utilizaron para el 7° subcultivo, sin embargo se logró que los frascos restantes mantuvieron el callo sin oxidación y sin contaminación (figura no. 37).



Figura no. 37. Fotografía tomada con microscopio estereoscópico de la proliferación de callo de la semilla 7 en el subcultivo no. 8.

En el lote 3, no se observó la respuesta de la formación de embriones somáticos como en el lote 2. Estos callos se pasaron a un medio MS (llamado MsE) para la generación de brotes, sin embargo después de varios subcultivos no se obtuvieron brotes. Cabe señalar que en ambos lotes se ha dejado el uso del antibiótico y no se ha obtenido presencia de contaminación en los subcultivos siguientes (Figura no. 38).



Figura no. 38. Callo de la semilla 9 del lote 3 en medio MsE.

5.5. Uso de los biorreactores

5.5.1. Construcción de los biorreactores

Tratamiento A

El Tratamiento A fue el establecimiento de los biorreactores con todos los explantes obtenidos de la semilla 7 de la planta 5 en medio T3 esterilizado en autoclave por 18 min. En la figura no. 39 se muestra el tratamiento A construido de dos biorreactores en la campana de flujo laminar.



Figura no. 39. Establecimiento del tratamiento A.

Para los agaves del tratamiento A se estableció un método de desinfección. Sin embargo, después de una semana de que el sistema funcionara los agaves se contaminaron y se detuvo el sistema. Para establecer el tratamiento B, se utilizaron nuevos explantes. Todos los explantes utilizados se obtuvieron de la semilla 6 de la planta 5 en medio T3 esterilizado en autoclave por 18 minutos. Figura no. 40.



Figura no. 40. Establecimiento del tratamiento B.

El establecimiento de los biorreactores para el tratamiento C se realizó con todos los explantes obtenidos de la semilla 7 de la planta 5 y con medio T3 esterilizado en autoclave por 18 min. En la figura no. 41 se muestra el sistema para el tratamiento C establecido en el cuarto de incubación.



Figura no. 41. Establecimiento del tratamiento C.

El sistema para el tratamiento D fue el establecimiento de los biorreactores con todos los explantes obtenidos de la semilla 8 de la planta 5 y con medio T3 esterilizado en autoclave por 18 min. En la figura no. 42 se muestra el sistema D establecido en el cuarto de incubación.



Figura no. 42. Establecimiento del tratamiento D.

5.5.2. Inducción de la organogénesis a través del uso de los biorreactores

Tratamiento A

A los 3 días los agaves empezaron a mostrar presencia de contaminación en el medio, a los 7 días esto se hizo más evidente y a los 8 días después del establecimiento del sistema se decidió suspenderlo y realizar una desinfección para los agaves contaminados.

Tratamiento B

En la figura no. 43 se observan los agaves del contenedor 1 y 2 después de 4 semanas al evaluar el tratamiento B. Se observó que no hubo diferencia al respecto del número de brotes iniciales y el número de brotes finales. También hubo pérdidas de hojas y se puede observar que sufrieron hiperhidratación a diferencia de los subcultivos en medio sólido con agar TC.

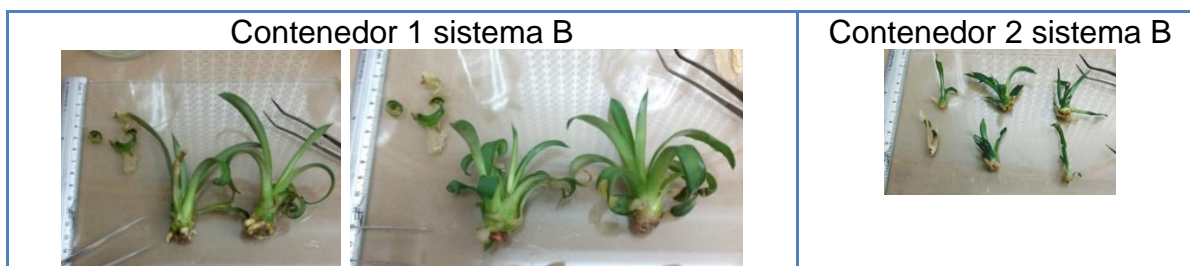


Figura no. 43. Agaves después de cuatro semanas en el tratamiento B.

Cabe destacar que el tratamiento B no tuvo presencia de contaminación, por lo que el tratamiento C se estableció en un medio con antibiótico y el mismo método de desinfección previo en los agaves.

Tratamiento C

Después de 4 semanas, los agaves del tratamiento C presentaron hidratación como en el tratamiento B. A diferencia del tratamiento B, en el tratamiento C hubo la formación de un brote en el contenedor 2, siendo 7 los agaves iniciales y como se muestra en la figura no. 45 se tiene un no. De brotes final de 8 agaves.

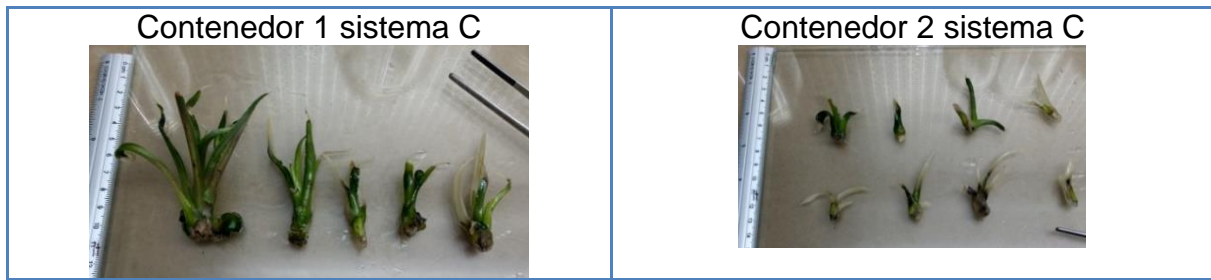


Figura no. 44. Agaves después de 4 semanas en el tratamiento C.

Tratamiento D

Después de 4 semanas, a diferencia de los tratamientos A, B y C, en el tratamiento D hubo formación de varios brotes aunque solo en el contenedor 2 donde el tamaño de los agaves era mayor que el tamaño que los agaves tenían en el contenedor 1 (figura no. 46).

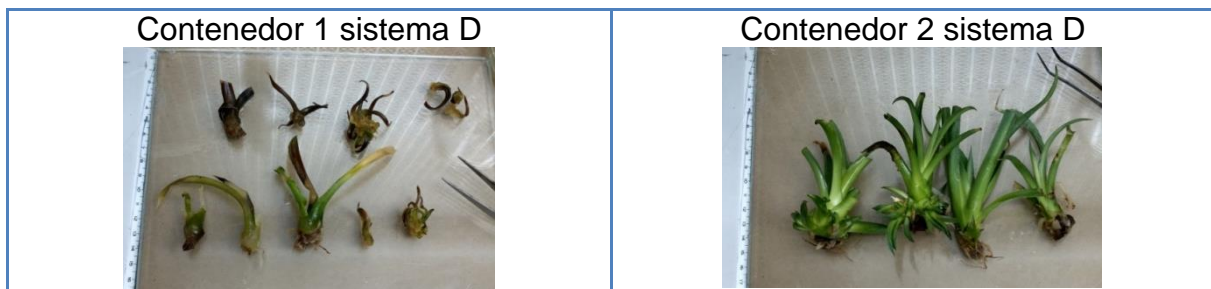


Figura no. 46. Agaves después de 4 semanas en el tratamiento C.

En la figura no. 47 se observan los dos agaves del contenedor 2 con sus respectivos brotes ya individualizados que se formaron durante su incubación en el biorreactor, uno de los agaves tuvo formación de 8 brotes, mientras que otro de ellos alcanzo la formación de 11 brotes adventicios.



Figura no. 45. Agaves con sus respectivos brotes del contenedor 2.

Después de las 4 semanas los agaves en los tratamientos B, C y D se subcultivaron en medio sólido T3 sin antibiótico (figura no. 48).

Tratamiento	CONTENEDOR 1	CONTENEDOR 2
Tratamiento B		
Tratamiento C		
Tratamiento D		

Figura no. 46. Agaves después de dos semanas en medio sólido T3.

En la tabla no. 18 se muestra la comparación del número de brotes y tamaño inicial y final de acuerdo al tratamiento utilizado en los biorreactores.

Tabla no. 18. Comparación de los resultados para el establecimiento de los biorreactores.

Tratamiento	Repetición	Parámetros					
		No. Planta y semilla	No. Brotes iniciales	Tamaño de brotes inicial	No. Brotes final	Tamaño de brotes final	No. de brotes hidratados
A	1	P5, S7	6	11 cm (todos)	-	-	-
	2	P5, S7	6	11 cm (todos)	-	-	-
B	1	P5, S6	4	10 (2 indiv.), 9 y 7 cm	4	13, 11, 9 y 7.5 cm	4
	2	P5, S6	6	2.5 a 3 cm (todos)	6	5.5 (5 indiv.) y 4 cm	6
C	1	P5, S7	5	5, 6, 7.5 (2 indiv.), y 9 cm	5	9, 8, 6 (2 indiv.) y 5 cm	5
	2	P5, S7	7	3 (3 indiv.) y 4 cm (4 indiv)	8	3 (2 indiv.), 4 (2 indiv.), 4.5 (2 indiv.), 5	8
D	1	P5, S8	8	2 (4 indiv.), 3 (3 indiv.) y 7 cm	9	3 (4 indiv.), 3.5, 4, 4.5, 5 y 12 cm	9
	2	P5, S8	4	8 (2 indiv.) y 9 cm (2 indiv.)	23	1 (10 indiv.), 2 (5 indiv.), 3.5 (4 indiv.) 9 cm (2 indiv.), 10 y 15 cm	3

6.DISCUSIÓN

6.1. Desinfección de semilla

Se estableció un protocolo de desinfección de semilla debido a que una de las dificultades para el establecimiento de *cultivos in vitro*, es la presencia de microorganismos contaminantes que afectan la viabilidad y el desarrollo de los explantes una vez que se han establecido *in vitro* (García Lozano, Mesa López, & Ocampo Guerrero, 2015).

Los hongos filamentosos y las bacterias son los contaminantes más frecuentes que causan pérdidas elevadas en el cultivo *in vitro* de plantas (Yelenys Alvarado, 1998), por ello el uso del antibiótico y el antimicótico incorporados al medio de cultivo durante la germinación y la propagación de agaves bajo condiciones asépticas.

6.2. Germinación *in vitro*

Las giberelinas han sido directamente implicadas en el control y la promoción de la germinación en diferentes especies. El remojo de semillas en AG3 promovió una mayor y más rápida germinación especialmente bajo la exposición a la luz ya que la iluminación promueve el efecto de AG3 en la germinación de semillas *in vitro* (Araya & Gómez, 2000).

6.3. Organogénesis *in vitro*

En los agaves del lote 2 a diferencia de los del lote 3, los reguladores de crecimiento tuvieron un efecto positivo en el número de brotes y el crecimiento de los agaves.

Varios autores como Choque Rojas, 2009 reporta el uso del agua de coco como un regulador de crecimiento obtenido los mejores resultados durante las

diferentes evaluaciones, que al igual que en este proyecto resultó ser indispensable en la organogénesis para la producción de brotes de agave.

Así mismo la adición de sorbitol y BA al medio representó un aumento de brotes, como sucede en otras especies, por ejemplo los resultados reportados para *Paulownia elongata*, que señala que mientras la concentración de BA era mayor, se obtuvo mayor número de brotes (Castellanos Hernandez, 2006).

En trabajos similares como el de Aureoles-Rodríguez *et al.*, quienes trabajaron con *Agave inaequidens koch* obtuvieron brotes al utilizar yemas axilares, lo que resultó en los medios establecidos con mayor concentración de BA. También se menciona en dicho trabajo a Santacruz *et al.* (1999) en *A. parrasana* y a Das (1992) en *A. sisalana* quienes de igual manera obtuvieron una respuesta positiva para la generación de brotes cuando adicionaron en el medio de cultivo BA en diferentes concentraciones (Aureoles-Rodríguez & Rodríguez de la O., 2018).

6.4. Embriogénesis somática

En respuesta a esta vía de regeneración, la formación de embriones a partir de células somáticas o sexuales fue posible debido a la influencia del uso de auxinas, en este caso el uso a diferentes concentraciones de 2,4-D. Siendo una auxina potente que evita la germinación y lo que provoca es un crecimiento desorganizado, se empleó a muy baja concentración y se obtuvo una mayor producción de callos. Sin embargo la mejor respuesta para la obtención de brotes se obtuvo cuando al callo en medio a concentración más alta de 2,4-D (N6pm1) se subcultivo en un medio sin la auxina. Todo ello indica que la multiplicación axilar y enraizamiento con el uso en medio de 2,4-D ejerce una acción positiva en su respuesta morfogénica, incluyendo además, la germinación y formación de brotes (Robert *et al.*, 1992; Peña *et al.*, 1996-1997).

6.5. Uso de los biorreactores

Se usaron materiales de naturaleza transparente para permitir el monitoreo constante del sistema de biorreactores y considerando que no presentaran degradación en el proceso de esterilización como sugirió Román Ancheyta (2014).

Los tiempos de inmersión y frecuencia fueron establecidos considerando las investigaciones en la implementación del uso de biorreactores BIT en agaves (Durán, 2015), (Ramírez, 2015), (Montejo Guzmán, 2016). En los ensayos que se realizaron en esta tesis se trató de ajustar el tiempo de inmersión y la frecuencia para la multiplicación de agaves. Y se obtuvo mejor resultado cuando la frecuencia fue de 5 min cada 24 horas.

Alvard y Teisson (1993) publican que la duración de la inmersión es probablemente uno de los factores de mayor atención en el diseño de sistemas de cultivo en medio líquido para especies propagadas *in vitro*. (Manfred, Flores, & Azofeifa, 2002).

Sin embargo aún no hay ensayos que refieran a la influencia del tamaño de los agaves en los biorreactores en el número de brotes.

A diferencia con lo reportado en *S. rebaudiana* (Alvarenga Venutolo & Salazar, 2015), los tratamientos produjeron altos niveles de hiperhidricidad.

Por otra parte, por tratarse de un proceso automatizado que provee condiciones de cultivo uniformes, el medio puede ser renovado fácilmente, sin tener que cambiar de contenedor y se siembra una mayor cantidad de explantes por envase de cultivo (Alvarenga Venutolo & Salazar, 2015).

7. CONCLUSIONES

- I. El método de desinfección utilizado fue eficiente ya que no se registró contaminación durante la incubación de las semillas en las siembras realizadas.
- II. La utilización del AG₃ para promover la germinación de las semillas fue eficiente ya que estimuló la germinación aumentando el porcentaje en un 10 % en comparación con los medios sin AG₃ en general.
- III. Se observó que el porcentaje de germinación depende de la planta productora de la semilla, ya que de las 5 plantas, las semillas provenientes de la planta 5 presentaron el mayor porcentaje de germinación (74%) en los 3 lotes establecidos mientras que las semillas de la planta 2 presentaron un porcentaje de germinación del 50 % como máximo.
- IV. Para la inducción de la organogénesis, se probaron cuatro medios (T1, T2, T3 y T4) variando la concentración de BA (2 y 3 mg.l⁻¹) y con y sin sorbitol. Los resultados demostraron que el mejor medio para la inducción de la organogénesis para todas las plantas fue el T3, el cual contenía 3 mg.l⁻¹ de BA y sin sorbitol, Y la planta que mayor no. de brotes produjo fue la P5, mientras que la planta P4 presentó el menor no. de brotes.
- V. La inducción de callo embriogénico se obtuvo a partir del establecimiento de semillas germinadas en medio N6i. Posteriormente para la proliferación del callo se probaron tres diferentes medios denominados N6p, N6pm, N6pm1 en los que se probaron distintas cantidades de 2,4-D (2, 2.5 y 3 mg.l⁻¹). La cinética de crecimiento demostró que en los medios N6p y N6pm se tuvo un comportamiento similar, mientras que en el N6pm1 se presentó un menor aumento de peso fresco en la 3^o semana, sin embargo su comportamiento demostró que el callo siguió proliferando en los tres medios. El 2,4-D por ser una auxina estimuló la proliferación de los callos del lote 2 de forma eficiente en los tres medios.

- VI. 6. La inducción de raíces se logró reduciendo las sales MS al 50 % lográndose que todas las plantas desarrollaran el sistema radicular.
- VII. Las semillas 6, 7 y 8 de la planta 5 fueron las de mayor número de brotes en el tratamiento 3, por lo que se utilizaron para el establecimiento de los biorreactores. Se estableció el diseño de prototipos de BIT, empleando frascos de vidrio de 1 L. de capacidad con tapas, empaques, mangueras y filtros hidrofóbicos de 0,22 μm , considerando todos los materiales del sistema autoclaveables.
- VIII. Los tratamientos probados en los biorreactores fueron A: 2 min de inmersión cada 6 horas sin antibiótico y el medio sin modificar, B: 2 min de inmersión cada 6 horas con antibiótico y el medio con modificación, C: 5 min de inmersión cada 12 horas con antibiótico y sin modificar el medio y D: 5 min de inmersión cada 24 horas con antibiótico y sin modificar el medio. De los tres tratamientos en los biorreactores, el tratamiento D presentó resultados satisfactorios en la formación de brotes ya que se sembraron 11 brotes en total de las dos repeticiones y al final se obtuvieron 36 brotes en ambas repeticiones.

1. ANEXOS

Medios de cultivo para embriogénesis de *Agave karwinskii*

		N6P	N6PM	N6PM1	
N6 (I-V)		100%	100%	100%	Nutrientes minerales (sales inorgánicas)
Cock 20	ml	10	10	10	Vitaminas
Adenina	ml	10	10	10	Regulador de crecimiento (citocinina)
L-Prolina	G	2.75/1	2.75/1	2.75/1	Aminoácidos
Caseína Hidrolizada	G	0.2	0.2	0.2	Nitrógeno Reducido
2,4-D	ml	20	25	30	Regulador de crecimiento (Auxina): Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
BA	ml	10	10	10	Regulador de crecimiento (citocinina): Benciladenina
Sacarosa	G	30	30	30	Compuesto orgánico (Fuente de carbono)
pH		5.7	5.7	5.7	
Agar TC	G	6.0	3.5	3.5	Agente gelificante
Cefotaxima	MI	0.5	0.5	0.5	Antibiótico

		N6p-G1	N6pm-G1	N6pm1-G2	
N6 (I-V)	ml	10	10	10	Nutrientes minerales (sales inorgánicas)
Vitamina R2	ml	10	10	10	Vitaminas
L-Glicina	ml	10	10	10	Aminoácidos
2,4-D	ml	10	12.5	15	Regulador de crecimiento (Auxina): Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
BA	ml	10	10	10	Regulador de crecimiento (citocinina): Benciladenina
Sacarosa	g	30	30	30	Compuesto orgánico (Fuente de carbono)
pH		5.7	5.7	5.7	
Agar TC	g	6	6	6	Agente gelificante

		N6p/N6pm/N6pm1 –G2		Inducción de brotes
N6 (I-V)	ml		10	Nutrientes minerales (sales inorgánicas)
Vitamina R2	ml		10	Vitaminas
L-Glicina	ml		10	Aminoácidos
BA	ml		10	Regulador de crecimiento (citocinina): Benciladenina
Sacarosa	g		30	Compuesto orgánico (Fuente de carbono)
pH			5.7	
Agar TC	g		6	Agente gelificante

MS E			
MS (I-V)	ml	10	Nutrimientos minerales (sales inorgánicas)
Vitamina R2	ml	10	Vitaminas
L-Glicina	ml	10	Aminoácidos
ANA	ml	10	Regulador de crecimiento (Auxina): Acido Naftalenacético
BA	ml	30	Regulador de crecimiento (citocinina): Benciladenina
Sacarosa	g	30	Compuesto orgánico (Fuente de carbono)
pH		5.7	
Agar TC	g	6.0	Agente gelificante

Medios de cultivo para organogénesis de *Agave karwinskii*

MS			Inducción
MS (I-V)	ml	10	Nutrimientos minerales (sales inorgánicas)
Vitamina R2	ml	10	Vitaminas
L-Glicina	ml	10	Aminoácidos
Sacarosa	g	30	Compuesto orgánico (Fuente de carbono)
pH		5.7	
Agar TC	g	6.0	Agente gelificante
Cefotaxima	ml	0.5	Antibiótico

Cantidad 1 l.	T1	T2	T3	T4	Proliferación	
MS (I-V)	ml	10	10	10	10	Nutrimientos minerales (sales inorgánicas)
Vitamina R2	ml	10	10	10	10	Vitaminas
L-Glutamina	g	0.05	0.05	0.05	0.05	Aminoácidos
Arginina	g	0.05	0.05	0.05	0.05	Aminoácidos
Agua de coco	ml	100	100	100	100	Regulador de crecimiento (citocinina)
ANA	ml	10	10	10	10	Regulador de crecimiento (Auxina): Acido Naftalenacético
Sorbitol	g		50		50	Compuesto orgánico (Fuente de carbono)
BA	ml	20	20	30	30	Regulador de crecimiento (citocinina): Benciladenina
Sacarosa	g	30	30	30	30	Compuesto orgánico (Fuente de carbono)
pH		5.7	5.7	5.7	5.7	
Agar TC	g	6	6	6	6	Agente gelificante

MS 1/2			Enraizamiento
MS (I-V)	ml	5	Nutrimientos minerales (sales inorgánicas)
Vitamina R2	ml	10	Vitaminas
L-Glicina	ml	10	Aminoácidos
BA	ml	10	Regulador de crecimiento (citocinina): Benciladenina
Sacarosa	g	30	Compuesto orgánico (Fuente de carbono)
pH		5.7	
Agar TC	g	6.0	Agente gelificante

Bibliografía

- Albarrán, J. (2017). Biorreactores de inmersión temporal para la propagación masiva de plantas. *Agronomía de la producción*, 7.
- Alvarenga Venutolo, S., & Salazar, T. (2015). Mass micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in temporary immersion systems. *Cultivos Tropicales*, 9.
- Ancheyta, S. R. (2014). *Propuesta de ingeniería para el diseño de un sistema de biorreactores y sistema de control para el análisis de la diferenciación de células madre (Tesis de licenciatura en Ingeniería bioquímica)*. México, D.F.: UNAM.
- Angeles del agave. (Febrero de 2018). *Mezcal Vago*. Recuperado el 25 de Mayo de 2018, de Mezcal Vago: <https://angelesdelagave.com/wp-content/uploads/2018/02/Madre-Cuixe-Fichas-T%C3%A9cnicas-.pdf>
- Araya, E., & Gómez, L. (2000). Efecto de la luz y del ácido giberelico sobre la germinación in vitro de Jaul (*Alnus acuminata*). *Agronomía Costarricense*, 75-80.
- Arzate Fernández, A. (2016). Regeneración de agave mezcalero (*Agave angustifolia* HAW.) a partir de embriones somáticos encapsulados. *Rev. Fototec*, 359-366.
- Aureoles-Rodríguez, F., & Rodríguez de la O., J. (2018). Propagación in vitro del 'Maguey bruto' (*Agave inaequidens* Koch). Una especie amenazada de interés económico. *Chapingo*, 253-269.
- Basail Pérez, M., Medero Vega, V., Otero Gálvez, E., & Torres Delgado, M. (2012). Use of Temporary Immersion Systems as an alternative for the in vitro propagation of the plantain cultivar 'INIVITPV06-30' (*Musa AAB*). *Bioteología Vegetal*, 53-57.

- Bello Bello, J., Martínez Estrada, E., & et al. (29 de Octubre de 2014). Comparison of three bioreactor systems for sugar cane commercial micropropagation. *Colegio de postgraduados Campus Córdoba*, 7.
- Calva Calva , D., & Pérez Vargas, D. (10 de Noviembre de 2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. *Revista digital universitaria*, 6(11), 3-16.
- Castellanos Hernandez, O. &. (2006). Organogénesis indirecta y enraizamiento in vitro de *Paulownia elongata*. *e-Gnosis*, 13.
- Choque Rojas, I. (2009). *Sustitución de reguladores de crecimiento por agua de coco (complejo natural) en el proceso de micropropagación en papa amarga (Solanum andigenum) (Tesis de Licenciatura en ingeniería agronómica)*. Bolivia: Universidad técnica de ORURO.
- CIATEJ. (2017). *Panorama del aprovechamiento de los agaves en México*. Guadalajara, Jalisco: conacyt, ciatej, agared.
- CONABIO. (2012). *Mezcales. diversidad biológica*. Recuperado el 14 de Mayo de 2018, de http://www.biodiversidad.gob.mx/ usos/mezcales/A_karwinskii.html
- Cuanax. (2018). *Tipos de Maguey*. Recuperado el 14 de Mayo de 2018, de Tipos de Maguey: <http://www.cuanaxmezcal.com/ tipos-de-maguey.html>
- Cuanax. (2018). *Tipos de Maguey*. Recuperado el 14 de Mayo de 2018, de Tipos de Maguey: <http://www.cuanaxmezcal.com/ tipos-de-maguey.html>
- Del Maguey Single Village Mezcal. (2015). *Del Maguey Single Village Mezcal*. Recuperado el 2 de Abril de 2018, de <http://delmaguey.com/madrecoixte-esp/?age-verified=4e7faf04e9>
- Diario Oficial de la Federación. (28 de Noviembre de 2003). *Modificación a la Declaración General de Protección de la Denominación de Origen "Mezcal" publicada en el Diario Oficial de la Federación (1994)*. Recuperado el Marzo de 2018, de http://www.wipo.int/wipolex/es/text.jsp?file_id=220974

- Durán, B. M. (2015). Micropropagación de *Agave durangensis* en un Sistema de Inmersión Temporal (SIT). *Jóvenes en la ciencia. Revista de divulgación científica*, 1-5.
- Escalona Morgado, M. (2014). *El Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) en la Micropropagación de plantas y su aplicación a las ornamentales*. Cuba: Centro de Bioplasmas.
- Freire Seijo, M. (2003). Aspectos básicos de la embriogénesis somática. *Biotecnología Vegetal*, 15.
- García Lozano, D. L., Mesa López, N., & Ocampo Guerrero, M. (2015). Estandarización del protocolo de desinfección para la micropropagación de *Aspidosperma polyneuron*. *UNAL*, 76-84.
- García Marín, D. S. (2006). *Proyecto CS007 Base de datos de nombres técnicos o de uso común en el México*: Centro de Investigación Científica de Yucatán AC.
- López Urrutla, R. E. (2004). *Diversidad genética de la población Agave Karwinskii Zucc. en el valle de Zapotitlán Salinas, Puebla (Tesis de licenciatura)*. México: Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
- Manfred, M., Flores, D., & Azofeifa, O. (2002). Establecimiento de un sistema de inmersión temporal para la micropropagación y el enraizamiento de *Bergenia spp var. Herbstblüte*. *Tecnología en marcha*, 75-81.
- Mendoza, A. J. (2007). Los agaves de México. *Ciencias* 87, 14-23.
- Mezcaloximoron*. (6 de Septiembre de 2017). Recuperado el 18 de mayo de 2018, de <https://mezcaloximoron.wordpress.com/2017/09/06/madrecuishe-agave-karwinskii/>
- Montejo Guzmán, A. B. (2016). UTILIZACIÓN DE UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT) PARA MULTIPLICAR PLANTAS ORNAMENTALES DE

AGAVE VICTORIAE-REGINAE (T. MOORE). *Jóvenes en la ciencia. Revista de divulgación científica*, 1429-1433.

Montes Vásquez, R. I. (2014). *Análisis de las condiciones geográficas y de producción del destilado de agave de Zumpahuacán, Estado de México para la obtención de la denominación de origen de mezcal (tesis de licenciatura)*. Tenancingo, Estado de México: Universidad Autónoma del Estado de México.

Palma, D. F. (Julio de 2016). *Mezcológica. Agave Karwinskii, agave microendémico*. Recuperado el 28 de Abril de 2018, de <http://mezcologia.mx/agave-karwinskii/>

Ramírez, C. S. (2015). ESTABLECIMIENTO DE AGAVE (Agave tequilana Weber var. azul) EN UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL (SIT). *Jóvenes en la ciencia. Revista de divulgación científica*, 54-59.

Ramírez, C. S. (2015). Establecimiento de agaves (Agave tequilana Weber var. azul) en un sistema de inmersión temporal (SIT). *Jóvenes en la ciencia. Revista de divulgación científica*, 54-59.

Rivero, M. (2018). *Agrobiotecnología. Biotecnología vegetal*. Recuperado el 2018, de INGEBI: <https://es.calameo.com/read/001119026b89c045cdf68>

Rubio, J. L., & Hernández, J. H. (2013). Propagación comercial de plantas ornamentales por cultivo in vitro de tejidos vegetales para beneficio social de la comunidad. *IIESCA*, 149-156.

Sánchez et al. (2016). Encapsulación del jarabe de agave. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 605.

Smith, R. (2006). *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments*. San Diego, USA: Elsevier.

Tirado, J. M., & Naranjo, E. J. (2005). Propagación in vitro de Phalaenopsis (Orchidaceae). *Revista colombiana de biotecnología*, 25-31.

Yelenys Alvarado, C. (1998). Control y prevención de la contaminación microbiana en la micropropagación de plantas. *CENIC*, 81-104.