

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y tecnología

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

**4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Micropropagación y estudios citogenéticos de especies de bulbosas
mexicanas en el CIATEJ**

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología, Alexandra Arenas Lozoya

Profesor PAP: Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez

Tlaquepaque, Jalisco, diciembre de 2023

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	4
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	4
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto	5
1.2 Caracterización de la organización.....	9
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	10
1.4. Planeación de alternativa(s).....	11
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	15
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	37
1.7. Bibliografía y otros recursos	41
1.8. Anexos generales.....	45
2. Productos	45
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	46
3.1 Sensibilización ante las realidades	46
3.2 Aprendizajes logrados	47

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

[Este texto deberá aparecer en todos los RPAP]

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.

El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).

El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.

El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.

El Reporte PAP consta de tres componentes:

El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.

El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.

El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

El presente PAP “Micropropagación y estudios citogenéticos de especies de bulbosas mexicanas en el CIATEJ” pertenece al Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I. El objetivo general fue desarrollar técnicas de micropropagación y estudios citogenéticos en especies de bulbosas mexicanas para su conservación y aprovechamiento. Los objetivos específicos incluyeron la micropropagación de *Tradescantia orchidophylla* mediante organogénesis indirecta, el análisis de mitosis en *Tradescantia orchidophylla* para determinar el número cromosómico, la relación entre la cantidad de cloroplastos en células guardas de estoma en *Sprekelia formosissima*, y la evaluación del efecto de diferentes longitudes de onda en la germinación de semillas de *Tigridia pavonia*.

Durante la evaluación de diversos medios de cultivo para la micropropagación de *Tradescantia orchidophylla* utilizando medio MS y SH, se observaron los efectos en explantes de hoja y bulbos. A pesar de los esfuerzos, no se logró identificar el medio ideal debido a limitaciones de material vegetal. En paralelo, se identificó una correlación negativa entre los niveles de ploidía y el número de cloroplastos en células guardas de los estomas en *Sprekelia formosissima*. El uso de Lugol facilitó la observación y conteo de los cloroplastos. Además, se evaluó el efecto de diferentes longitudes de onda en las semillas de *Tigridia pavonia*. Tras comparar siete colores distintos, se concluyó que la luz verde es la más beneficiosa para esta especie.

1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

El presente PAP se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ). El Centro forma parte de la Coordinación de Medio Ambiente, Salud y Alimentación del Sistema de Centros Públicos de Investigación (CPI) del

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conahcyt). El CIATEJ se divide en varias líneas de investigación como son: biotecnología ambiental, alimentaria, industrial, farmacéutica y vegetal [1].

El proyecto pertenece al área de biotecnología vegetal, ya que tiene enfoque en el sector tanto agrícola, como agropecuario y agroindustrial [2]. El PAP es de tipo experimental el cual se basa en el desarrollo de métodos de micropropagación de plantas de bulbo y sus estudios citogenéticos. El propósito del proyecto es adquirir información acerca del número cromosómico y la ploidía de especies bulbosas de las cuales no se encuentra información al respecto, así como llevar a cabo la micropropagación en diferentes medios de cultivo para encontrar el indicado.

Objetivo general

Micropropagar y caracterizar citogenéticamente las especies *Sprekelia formosissima*, *Tradescantia orchidophylla* y *Tigridia pavonia* para generar información sobre su estructura cromosómica y encontrar un medio adecuado para su crecimiento *in vitro*.

Objetivos específicos

- Micropropagar *Tradescantia orchidophylla* mediante organogénesis indirecta.
- Analizar la mitosis en *Tradescantia orchidophylla* para determinar el número cromosómico de las especies.
- Relacionar la cantidad de cloroplastos en células guardas de estoma con diferentes niveles de ploidía en *Sprekelia formosissima*.
- Analizar el efecto de diferentes longitudes de onda en la germinación de semillas *in vitro* de *Tigridia pavonia*.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

La forma tradicional de propagar plantas bulbosas implica dividir los bulbillos adventicios que se forman naturalmente en el bulbo subterráneo de la planta madre. Estos bulbillos se retiran y se vuelven a plantar en el suelo o en otra maceta. Por otro lado, este método de

propagación tiene limitaciones, ya que un solo bulbo madre produce de dos a tres bulbillos después de un año de cultivo. Además, la propagación sexual de estas especies es limitada, debido a que sus semillas no son viables. Por lo tanto, es necesario explorar otras opciones que permitan obtener un mayor número de plantas en entornos de producción comercial [3].

Una alternativa viable es la micropropagación, procedimiento que se utiliza para obtener una alta cantidad de explantes clonados en un breve periodo. Los explantes típicamente empleados para iniciar la micropropagación incluyen el meristemo, la punta del brote y las yemas axilares. El ápice, o punta del brote, es ideal para la propagación clonal *in vitro*, sin embargo, cuando se busca producir una variedad de plantas se utiliza el meristemo. Por otro lado, en la axila del nudo se encuentran las yemas axilares, que consisten en células meristemáticas (Figura 1). La capacidad de utilizar estas yemas depende de si se encuentra en estado activo o latente la planta [4].

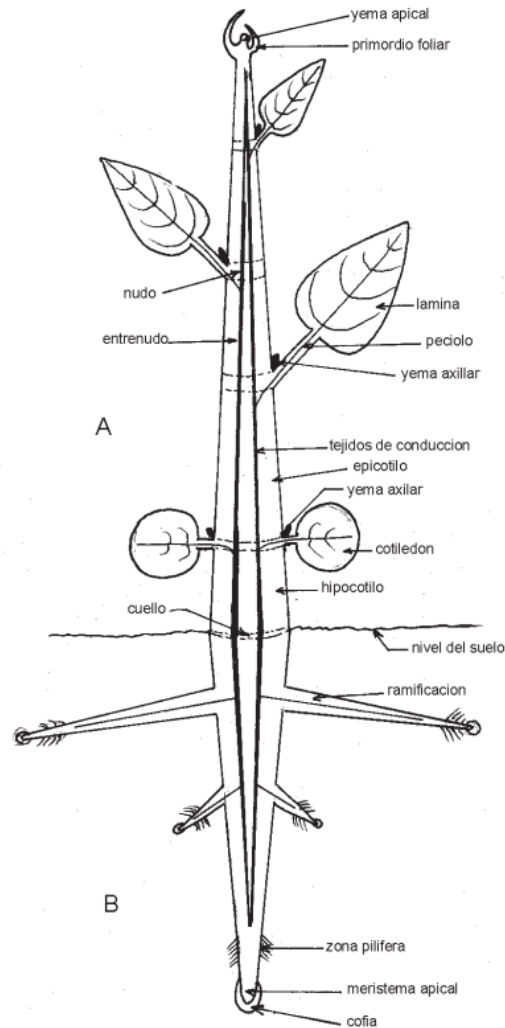


Figura 1. Esquema de los órganos de la planta vascular. A) Tallo y hojas. B) Raíz. [5]

Para garantizar la producción y la conservación de las plantas de alta calidad genética y cromosómica, es necesario emplear tanto técnicas de micropropagación como de citogenética. La micropropagación permite la clonación de plantas de gran calidad, mientras que la citogenética brinda herramientas para evaluar y garantizar la estabilidad genómica y la calidad de las plantas propagadas [6]

La citogenética es una rama multidisciplinaria que estudia los genomas nucleares desde una perspectiva cromosómica. Es un campo científico que se dedica a la investigación sobre la estructura, cantidad, funcionalidad y dinámica de los cromosomas, así como a las múltiples alteraciones que estas características pueden experimentar a lo largo del tiempo, y su relación

con la herencia, la recombinación y la actividad génica [7]. Para tener una visión completa de la genética de las plantas, desde su organización cromosómica hasta su expresión génica y evolución, es esencial llevar a cabo estudios que involucren tanto la citogenética como la investigación de los genes ARN ribosomal.

Los genes del ARN ribosomal (ARNr) están presentes en todos los organismos y se utilizan ampliamente para estudiar y comparar la evolución molecular de diferentes grupos taxonómicos [8]. La investigación del ADNr de las plantas se ha enfocado en el examen de la evolución y la filogenia. Esto se debe a que la naturaleza conserva los genes ribosomales los cuales actúan como herramientas que simplifican la estrategia de estudio para comprender la estructura del genoma [9]. La evolución a nivel molecular resulta ser un fenómeno intrigante debido a que existen muchas similitudes en secuencias entre los miembros de familias multigénicas [8]. Por lo tanto, la detección y caracterización del ADNr de las plantas bulbosas es esencial, dado que existen carencias de datos sobre estas especies. El presente PAP contribuirá a comprender las relaciones evolutivas entre las especies, evaluar los factores ambientales que las afectan y mejorar el cultivo.

La biotecnología vegetal, a través de la utilización de tejidos vegetales y la citogenética, brinda un método ágil y confiable para la producción de un gran número de plantas con idénticas características genéticas. Además, estas técnicas desempeñan un papel crucial en la obtención de plántulas de especies hortícolas de valor comercial y ornamental, así como en la conservación *ex situ* de la flora silvestre. Estas metodologías permiten la generación de material vegetal para su empleo en proyectos de restauración ecológica, introducción o reintroducción de especies, especialmente en situaciones en las que la propagación tradicional de la especie es lenta, poco eficiente, con tasas de multiplicación reducidas o cuando la población natural es sumamente limitada [10].

Se ha observado la importancia de las plantas ornamentales en el ecosistema, no obstante, es común la importación de estas especies en lugar de dar prioridad a las especies nativas. Sin embargo, en las últimas décadas, el acceso a la información sobre especies autóctonas ha impulsado un cambio hacia el uso de plantas nativas en lugar de especies foráneas,

principalmente debido a su mayor rentabilidad, además de que la producción de las especies exóticas puede perturbar el equilibrio del ecosistema. México cuenta con una diversidad de climas que favorecen la producción de flores y plantas ornamentales. A pesar de ello, la actividad comercial de plantas ornamentales es relativamente reciente, con sus inicios en la década de 1970. Esto sugiere que todavía hay oportunidades de crecimiento en el mercado de plantas ornamentales en el país [11].

La introducción de plantas ornamentales nativas en lugar de importarlas se centra en considerar los beneficios culturales, económicos y ambientales para las comunidades locales y el entorno natural al utilizar y valorar las especies autóctonas en el paisaje y la jardinería. Al promover el cultivo y la venta de plantas autóctonas, se fomenta la creación de empleo y el desarrollo de la industria hortícola local. El uso de plantas ornamentales nativas promueve la conservación del medio ambiente al reducir la extracción de especies silvestres y fomentar el cultivo de plantas autóctonas, lo que contribuye a preservar la biodiversidad y los ecosistemas locales. El uso de plantas ornamentales nativas resalta la identidad cultural y el patrimonio de la comunidad, fortaleciendo así el sentido de pertenencia y promoviendo la valoración de la cultura local [12].

1.2 Caracterización de la organización

El CIATEJ tiene la misión de impulsar “el desarrollo sostenible de la sociedad, mediante la generación de conocimiento de vanguardia, formación de talento especializado y aplicación innovadora de la ciencia y tecnología”. Asimismo, tiene la visión de fomentar “el conocimiento e innovación tecnológica, a través de redes de colaboración nacionales e internacionales y alianzas con los sectores público y privado para contribuir al desarrollo sostenible de la sociedad” [1].

Este centro cuenta con dos sedes en el estado de Jalisco, en los municipios de Guadalajara y Zapopan. El presente PAP se desarrolla en la sede Zapopan, situada en Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco. Esta sede está dirigida por la Doctora Anne Christine Gschaedler Mathis y el departamento de biotecnología vegetal está bajo la dirección de la Doctora Antonia Gutiérrez Mora. En dicho departamento, se cuenta con un amplio grupo de

investigadores, entre los cuales destaca el Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez, quien es el responsable del PAP. El Dr. Rodríguez posee un Doctorado en Ciencia y Tecnología en Biotecnología y desempeña el cargo de investigador en Biotecnología Vegetal, centrándose en la micropropagación y mejoramiento genético de agaves y especies ornamentales [2].

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

Se utiliza el término “planta bulbosa” para las plantas cuyo órgano de crecimiento principal es un bulbo, cormo, rizoma, túbero, tubérculo, tallo, tuberoso, pseudobulbo o una raíz tuberosa. En otras palabras, se refiere a toda planta que tenga tallos o raíces en estructuras engrosadas que les permiten almacenar carbohidratos o humedad durante ciertos periodos de su ciclo de vida [13]. La propagación vegetativa en condiciones naturales llega a ser limitada produciendo en algunas un bulbo al año o ninguno [14]. La producción de bulbos es un proceso bastante complejo, el cual requiere inversiones en instalaciones, terreno, maquinaria y material vegetal; además, la información disponible acerca de los bulbos es muy limitada [15].

La propagación asexual de las plantas bulbosas se fundamenta en la generación de bulbillos, el cual es un proceso lento que requiere de varios años. Debido a que la propagación vegetativa en condiciones naturales es muy limitada, es fundamental encontrar otro método de propagación que permita incrementar el número de plantas obtenidas en sistemas de producción comercial, siendo la técnica de cultivo *in vitro* una alternativa. Sin embargo, actualmente, se desconoce el medio de cultivo ideal para micropropagar estas bulbosas [14], debido a que no existe información disponible sobre su formulación.

Para conservar y estudiar las plantas bulbosas, que han recibido escasa atención hasta el momento, es esencial llevar a cabo investigaciones en su citogenética. Esta disciplina permite una propagación eficaz de estas plantas con diversos propósitos, que van desde la conservación hasta la mejora genética y la investigación.

La citogenética es importante debido a que proporciona información crucial sobre la estructura y la función de los cromosomas, así como desempeña un papel crítico en la

investigación, mejoramiento de cultivos y la conservación de biodiversidad vegetal. Los mapas citogenéticos permiten ubicar los genes, así como los marcadores ligados a éstos (centrómeros, telómeros, constricciones secundarias) [16]. No obstante, no se encuentran registros de estos datos para varias especies de bulbosas.

1.4. Planeación de alternativa(s)

Como ya se ha mencionado anteriormente, el presente proyecto se divide en dos partes: micropropagación y estudios citogenéticos. Las plantas bulbosas de este estudio son plantas ornamentales de las cuales no se conoce mucha información, por lo que propagarlas *in vitro* es todo un reto.

Las plantas pueden reproducirse de dos maneras: sexual y asexualmente, dependiendo de su nivel de evolución. En la reproducción sexual, las plantas se originan a partir de la combinación de gametos provenientes de los progenitores, lo que da como resultado embriones que se desarrollan en forma de semillas. Por otro lado, la reproducción asexual implica la creación de nuevas plantas a partir de células somáticas, manteniendo así la misma composición genética de la célula madre [17].

La micropropagación es una técnica que tiene potencial de aumentar la producción al permitir la generación de plantas resistentes a enfermedades que afectan a los cultivos. Para llevar a cabo la micropropagación *in vitro* de plantas, existen varios métodos como: organogénesis, embriogénesis somática y proliferación de yemas axilares [4].

Uno de los métodos utilizados es la embriogénesis somática que ocurre cuando una célula somática sufre una desdiferenciación y se convierte en una célula madre embrionaria totipotente capaz de originar un embrión *in vitro*. Esta técnica puede utilizarse como un modelo accesible para investigar los eventos iniciales de desarrollo del embrión cigótico en el ciclo de vida de las plantas [18].

Luego, se encuentra la proliferación de yemas axilares, que es una metodología muy utilizada debido a que garantiza la estabilidad genética de las plantas regeneradas. Esta técnica se basa en estimular el crecimiento de las yemas laterales para que se conviertan en brotes, implica el cultivo de los meristemos y las puntas de los brotes, así como el cultivo de las yemas. Este

método sigue la ruta de desarrollo ontogenético de las plantas a través de los meristemos laterales [19].

Otra de las técnicas utilizadas es la micropropagación por organogénesis, la cual se basa en la regeneración de órganos completos que no existían previamente. Existen dos tipos de organogénesis: regeneración directa, que implica el desarrollo de órganos directamente a partir de explantes, y la regeneración indirecta, que involucra una fase intermedia de callo no diferenciado [20]. La metodología de organogénesis indirecta se utilizará en el presente PAP para la especie de *Tradescantia orchidophylla* debido a que permite la producción más rápida de plantas en masa y es una técnica que tiene una tasa de éxito más alta en la formación de brotes en esta especie.

La otra parte del proyecto incluye los estudios citogenéticos. Las técnicas citogenéticas más comunes incluyen: squash, spreading, dropping y steamdrop. “Squash” o “squashing” es un procedimiento que desempeña un papel fundamental en el análisis cromosómico de especies vegetales. A pesar de ello, presenta desafíos debido a los instrumentos utilizados, los cuales dificultan la obtención de células vegetales de alta calidad para cromosomas en metafase [21].

La segunda técnica, “spreading” o “air drying”, consiste en crear una suspensión celular preparada directamente en un portaobjetos mediante la trituración con la punta de una aguja. Este método es adecuado para plantas con cromosomas de menor tamaño [21] [22].

Una alternativa más es el método “dropping” o “drop”, proceso en el cual se extraen y purifican los núcleos para formar una suspensión que luego se aplica desde cierta altura en láminas, provocando así la ruptura de los núcleos y la dispersión celular. No obstante, este método presenta una baja tasa de mitosis debido a la pérdida de células durante el aislamiento, así como daño de los protoplastos en metafase [23].

Otra alternativa es el “SteamDrop”, el cual se ha decidido utilizar en el presente PAP debido a su capacidad para fijar los cromosomas mitóticos y meióticos de las plantas, incluyendo los cromosomas de gran tamaño, que representa uno de los objetivos del proyecto. Esta estrategia se basa en una digestión enzimática de las raíces meristemáticas para generar una suspensión celular. Después de realizar el lavado de la suspensión con agua, ácido acético y etanol, se

coloca sobre un portaobjetos de vidrio y se deja secando. Un elemento crucial radica en el uso de vapor, generado mediante el Baño María, durante la evaporación del fijador para proporcionar la humedad y la temperatura necesarias para la adecuada dispersión de los cromosomas [22].

Una vez que se tienen los cromosomas completamente dispersos, se utiliza el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), tinte fluorescente que tiene una afinidad por las regiones ricas en adenina y timina en el ADN [24]. Después de teñir estas regiones, se emplea la microscopía de fluorescencia (microscopio Leica DM5500B-CS spectral confocal TCS SPE RGBV) para la visualización de cromosomas en las muestras fijadas, poder empezar a contarlos y determinar su nivel de ploidía.

Se muestra, en la Tabla 1, el plan de trabajo del presente PAP. Se especifican los recursos humanos, materiales, y tecnológicos necesarios para cumplir cada actividad requerida en cada semana hasta el final del semestre y los detalles se encuentran en la Tabla 2.

Tabla 1. Cronograma de actividades previstas para la realización del PAP.

Nombre de la actividad	Recursos	Tiempo (días)	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15	Semana 16
Análisis de bibliografía	TP	16																
Preparación de medio de cultivo para <i>T. orchidophylla</i>	AU BM	5																
Recolección de explantes	CF ME	8																
Trasplante a macetas y poda de raíces	MC	7																
Revisión de cultivos <i>in vitro</i>	TP	27																
Establecimiento de semillas/explantes	CF SL ME	12																

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

En el desarrollo del presente PAP se recolectó material vegetal tanto del invernadero de CIATEJ como de regiones del estado de Jalisco, para realizar los objetivos establecidos los cuales incluyen germinación de semillas, evaluación del nivel de ploidía, análisis citogenético y micropropagación por explantes (Tabla 1). Debido a que el material vegetal tiene interacción con varios microorganismos se tuvieron que someter a desinfecciones y lavados para poder remover tanto la tierra como alguna bacteria u hongo que se encontrara. Una vez que el material se encontraba desinfectado se sembró en medios de cultivo y se esperaba a tener suficiente material para poder hacer los experimentos.

Tabla 3. Descripción de los experimentos realizados a lo largo del PAP

Número del experimento	Descripción
1	Germinación de semillas de <i>Tigridia pavonia</i>
2	Evaluación del nivel de ploidía en <i>Sprekelia formosissima</i>
3	Análisis citogenético de <i>Tradescantia orchidophylla</i>
4	Micropropagación por explante de <i>Tradescantia orchidophylla</i>

Desinfección de material vegetal

Primero se tomaron las hojas que se encontraban en mejor estado (libre de hongo, de bacteria), se colocaron en agua destilada y se les realizaron 3 lavados con agua destilada para quitarles la tierra. Luego se realizó un lavado con agua destilada y jabón comercial (4 gotas) por 5 minutos y se prosiguió a hacer 4 lavados más con agua destilada para retirar el jabón. En seguida se colocaron las hojas en agua destilada con bactericida (Bactrol 1g/L) y fungicida (Captan 1 g/L) y se dejó en agitación por 24 horas.

Lavado de material vegetal en campana de flujo laminar

Una vez ya desinfectado el material vegetal, se colocó el recipiente donde se encontraban los explantes dentro de la campana de flujo laminar y se realizaron enjuagues con alcohol al 70% por 1 minuto, se vertió el contenido en un recipiente de desechos y luego se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril de 5 minutos cada uno. Después se descartó el líquido y se realizó un enjuague con cloro comercial al 2% por 10 minutos, se retiró el líquido y se repitieron los lavados con agua destilada estéril y se desechó el agua. Por último, se realizó

un enjuague con nanopartículas de plata por 10 minutos y se repitieron los enjuagues con agua destilada estéril.

Experimento 1: Germinación de semillas de Tigridia pavonia

La planta bulbosa *T. pavonia* (Figura 2 A), presenta tanto flor y semillas (Figura 2 B), como bulbo (Figura 2 C). Al ser una planta silvestre se intentó propagar de dos maneras. La primera fue que de las 9 plantas que se tenían, a 3 se les cortó el bulbo y se plantó cada uno en una maceta. La segunda forma de propagación fue colocar las 6 plantas completas y las 3 sin bulbo en maceta y esperar a que las semillas maduraran para poder sembrarlas *in vitro*. Esto para ver cuál método producía más material para poder analizar la mitosis de la especie.

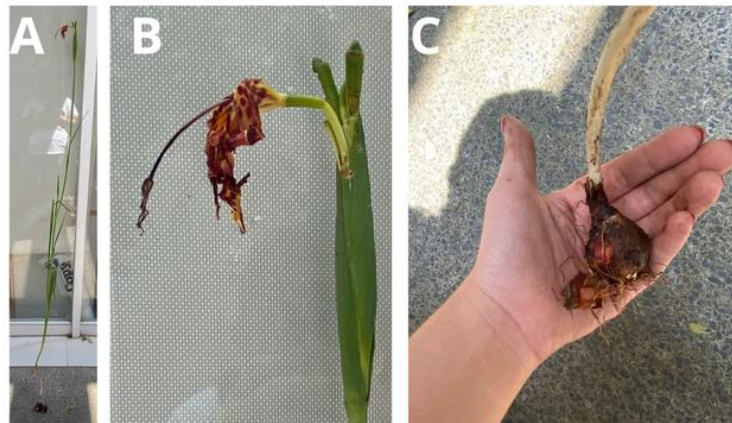


Figura 2. Planta *Tigridia pavonia*. A) Planta completa donde se observa desde el bulbo hasta la flor. B) Flor y semillas de *T. pavonia*. C) Bulbo de *T. pavonia*.

Para propagar utilizando bulbo (Figura 3), primero se retiraron varias capas de este hasta llegar a lo que se ve en la Figura 3 A, al igual que se le removieron las raíces que presentaba para estimular el crecimiento de nuevas. Cinco días después de ponerlas en maceta, solo uno de los tres bulbos presentó inicios de crecimiento de raíz (Figura 3 B). A los 16 días, el bulbo se encontraba pudriéndose y sin algún crecimiento nuevo de raíces (Figura 3 C), por lo que después del día 16 que se sembraron se descartó la propagación a partir de bulbos.



Figura 3. Bulbo *Tigridia pavonia*. A) Día 0 de ser cortado y sembrado en maceta. B) Día 5 de ser cortado y sembrado en maceta. C) Día 16 de ser cortado y sembrado en maceta.

Para propagar utilizando las semillas, primero se colocaron las plantas *T. pavonia*, que tenían bulbo en macetas, en el invernadero y se sujetaron con un listón a un soporte para mantenerse rectas debido a que su peso no permitía que se mantuvieran rectas (Figura 4 A). A las plantas que presentaban semillas en “capucha abierta”, como se muestra en la Figura 4 B, se les colocó una bolsa de papel (Figura 4 C) para que en caso de que maduraran y se empezaran a caer pudieran ser recolectadas por la bolsa. A las semillas en “capucha cerrada” no se les colocó nada. Al final, solo a 4 de las 9 plantas se les colocó una bolsa de papel.

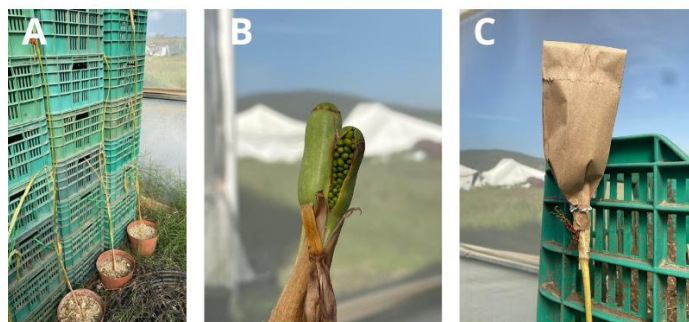


Figura 4. *Tigridia pavonia* en invernadero. A) *T. pavonia* amarrada con listones a columna de cajas para mantenerla recta. B) Semillas en “capucha abierta”. C) Semillas con bolsa de papel.

Después de tener la bolsa de papel sobre las semillas de *T. pavonia* durante 21 días, se decidió retirar solo dos de las plantas. Sin embargo, como se observa en la Figura 5 A, una bolsa se humedeció lo que provocó que la flor y las semillas se contaminaran de hongo (Figura 5 B), mientras que la segunda bolsa no se humedeció, pero las semillas no se encontraban maduras aún para ser sembradas *in vitro* (Figura 5 C). Se decidió recolectar las semillas de ambos casos y se dejaron guardadas dos días para ver si provocaba algún cambio de color. Las semillas de la planta que adquirió hongo se presentan en la Figura 5 D, mientras que las semillas no maduras se presentan en la Figura 5 E.



Figura 5. Recolección de semillas de *Tigridia pavonia*. A) Semillas cubiertas con bolsa de papel. B) Planta que fue infestada por hongo. C) Semillas que no alcanzaron a madurar. D) Semillas de la planta infestada por hongo. E) Semillas inmaduras después de ser guardadas por dos días.

Una vez que se recolectaron las semillas de *Tigridia pavonia*, se desinfectaron y lavaron las semillas. Primero se colocaron las semillas en un infusor metálico (Figura 6) en un frasco de medio litro, se lavaron con agua de la llave, incorporando 5 gotas de jabón comercial, y se procedió a agitar por un período de 5 minutos dentro de un bote de medio litro. Una vez transcurrido el tiempo, se realizaron lavados con agua de la llave para eliminar las burbujas generadas por el jabón. Después, se transfirieron las semillas a un tubo Falcon de 15 mL.

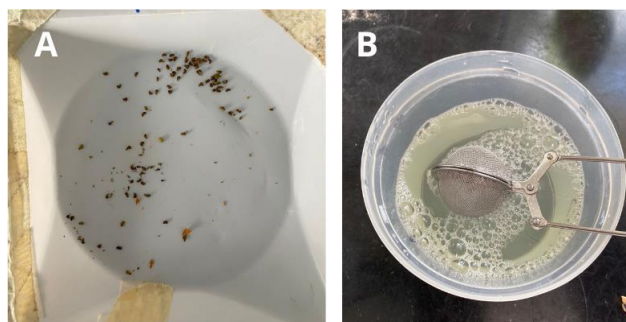


Figura 6. Desinfección de semillas de *Tigridia pavonia* para su siembra en medio *in vitro*. A) Semillas de *Tigridia pavonia*. B) Desinfección de semillas de *T. pavonia* utilizando un infusor metálico.

Posteriormente, en campana de flujo laminar, se realizó un lavado de las semillas con alcohol al 70% por 1 minuto y consiguiente se vertió el líquido en un bote de residuos. Luego se pasaron a cloro comercial al 3% por 10 minutos, agitando constantemente y al acabar el periodo se vertió el cloro en otro bote de residuos. Por último, se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril, cada uno duró 5 minutos y después de cada uno se vertía el líquido a

un bote de residuos. En el caso de *Tigridia pavonia*, se preparó un medio de cultivo para germinación cuya composición se encuentra en la Tabla 4.

Para la preparación del medio para la germinación de semillas, se utilizó el medio MS Stock, disolviéndolo inicialmente en 250 mL de agua destilada y añadiéndole sacarosa. Luego, la solución se llevó hasta 1 L mediante el uso de una probeta, y se ajustó el pH a 5.8. La mezcla se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 1L, al que se añadió agar. A continuación, se calentó la mezcla en el microondas durante 1 min, se extrajo para agitar y se repitió el proceso de calentamiento hasta que el agar se disolvió por completo, se vertió en 7 botes de plástico de medio litro. Después se esterilizó el medio de germinación en autoclave a 121°C y 15 lb/in² de presión durante 15 minutos. Se dejó gelificar el medio en campana de flujo laminar y posteriormente se sembraron 10 semillas por bote en 7 botes, que fueron sellados con cinta kleen pack y colocados en el incubador.

Tabla 4. Composición del medio para germinación de semillas

Compuesto	Concentración
Medio MS Stock	10 mL/L
Sacarosa	3 g/L
Agar	8 g/L
pH	5.8 ± 0.02

Al experimento de propagación a partir de semilla se agregó un nuevo factor, diferentes colores para determinar el efecto de las distintas longitudes de onda de luz en la germinación de semillas (Figura 7). Los colores de celofán utilizados fueron: amarillo, naranja, verde, rojo, azul y morado, así como también se utilizó un celofán incoloro como testigo. Al mismo tiempo, se desinfectaron y se sembraron 10 semillas de jitomate saladette (*Solanum lycopersicum*) en 7 botes. El propósito de realizar la siembra simultánea de *Tigridia pavonia* y de *Solanum lycopersicum* fue debido a que *S. lycopersicum* germina en menor tiempo que *T. pavonia* lo que permitirá determinar el efecto de las longitudes de onda en el tiempo resignado al presente PAP.



Figura 7. Botes con semilla de jitomate saladette y *Tigridia pavonia* en incubación cubiertos de papel celofán de 7 colores. A) Botes cubiertos de color: verde, naranja, incoloro (usado como testigo) y rojo. C) Botes cubiertos de color: morado, amarillo y azul.

Se evidenció que en *S. lycopersicum*, la luz azul, con una intensidad de 1070 lux y una exposición de 24 días, promovió la germinación máxima (30%), destacándose como la más propicia para este proceso en comparación con otras fuentes de luz evaluadas. Le siguió la luz naranja con una intensidad de 1384 lux, que provocó un 20% de germinación. Por otro lado, la luz amarilla (2840 lux) mostró un 10% de germinación, al igual que la luz morada (1070 lux), la luz verde (870 lux) y la luz blanca (incoloro) (1960 lux). En contraste, la luz roja (440 lux), no generó germinación, como se muestra en la Tabla 5.

En el caso de *Tigridia pavonia*, se observó contaminación de la mayoría de las semillas en los 7 botes a los 5 días después de su siembra, posiblemente causada por la presencia de hongos en las plantas de las cuales se recolectaron las semillas. Ante esta situación, se recolectaron nuevas semillas del invernadero, se desinfectaron como mencionado anteriormente, sembraron en medio de germinación y envolvieron con celofán de colores. Después de 14 días, se observó que solo en el bote envuelto con celofán rojo presentaba una semilla contaminada. Además, se notó que el color verde produjo una germinación máxima del 40%, el color rojo alcanzó un 30% y el bote testigo (incoloro) alcanzó un 20%, mientras que los demás colores no mostraron germinación, así como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados de germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* y *Tigridia pavonia* sometidas a diferentes longitudes de onda en un lapso de 14 a 24 días.

Color	<i>Solanum lycopersicum</i> (# semillas germinadas)	<i>Tigridia pavonia</i> (# semillas germinadas)
Amarillo (2840 lux)	1	0

Naranja (1384 lux)	2	0
Verde (870 lux)	1	4
Rojo (440 lux)	0	3
Azul (1070 lux)	3	0
Morado (1270 lux)	1	0
Incoloro (1960 lux)	1	2

Sin embargo, el experimento continúa en curso, por lo que aún no se han obtenido resultados finales. Se espera que dichos resultados sean publicados en una revista de difusión una vez disponibles.

Experimento 2: Evaluación de nivel de plodía de Sprekelia formosissima

Los estomas, esenciales en la regulación de la transpiración y el intercambio gaseoso para la fotosíntesis y la respiración [25], presentan una relación con el nivel de ploidía en diversas especies. En el caso de *S. formosissima*, los estomas se encuentran en la parte inferior (abaxial) de la hoja, minimizando así la pérdida de agua a través de la transpiración. Este fenómeno motivó la realización de un experimento para detallar las particularidades de los estomas presentes en las hojas de *S. formosissima* en diferentes niveles de ploidía (2x, 4x y 5x).

La diversidad de *S. formosissima* se asocia al proceso evolutivo que incide en el número de cromosomas (nivel de ploidía), generando modificaciones en la producción de sustancias y la capacidad de adaptación a distintos entornos. Los estudios citogenéticos son esenciales para comprender y describir estas especies marcando así su desarrollo evolutivo. La determinación de nivel de ploidía se puede llevar a cabo mediante el conteo de cromosomas, citometría de flujo y su relación con la densidad estomática y el número de cloroplastos en las células guardas de los estomas [26]. En el presente experimento se decidió optar por determinar el nivel de ploidía mediante la relación de cloroplastos en células guardas de estomas.

La especie *S. formosissima* se encontraba ya en forma de semilla en medio *in vitro* (sembrada el 1 de agosto) y en incubadora cuando se inició el presente proyecto (Figura 8 A). Además,

en la incubadora se encontraban botes con semillas diploides (2x) y tetraploides (4x), por lo que no fue necesario realizar ninguna desinfección de semillas, sino un seguimiento de su crecimiento. Las plántulas de *S. formosissima* diploide (Figura 8 B), empezaron a germinar después de 33 días en incubación.

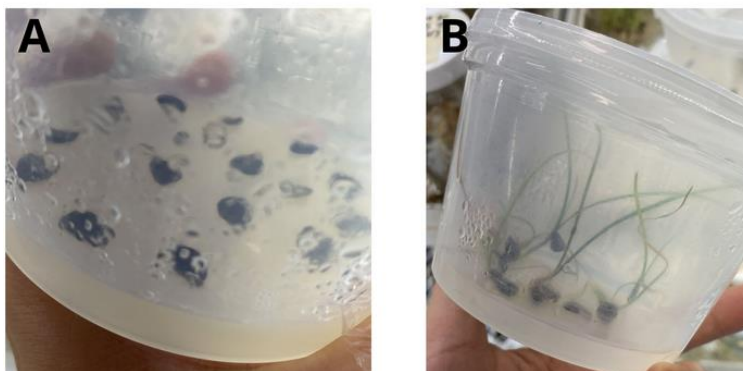


Figura 8. Germinación de semilla de *Sprekelia formosissima* 2x. A) Día 23 desde la siembra de semillas. B) Día 33 desde la siembra de semillas.

Seguidamente de observar un crecimiento en *S. formosissima* 2x, se realizó el medio descrito en la Tabla 6 para favorecer la fase de enraizamiento y multiplicación de la planta. Primero se utilizaron 150 mL de agua destilada para disolver la sacarosa en medio MS. Luego, se agregaron las fitohormonas, se ajustó el pH y se adicionó agua destilada hasta lograr un volumen de 0.5 L. Posteriormente, se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 1 litro, al cual se le agregó agar y se disolvió calentando la solución en el microondas. El contenido se distribuyó en 9 recipientes de plástico con capacidad de medio litro, los cuales fueron esterilizados en autoclave y sellados con conta kleen pack.

Tabla 6. Composición del medio para la proliferación de hojas

Proliferación de hojas	
Medio MS stock	100 mL/L
Sacarosa	30 g/L
BA	10 mL/L
2,4-D	25 µL/L
Agar	8 g/L
pH	5.8 ± 0.02

Una vez esterilizado el medio de proliferación MS y dentro de la campana de flujo laminar, se extrajeron las plantas ya germinadas y se colocaron en un vidrio de corte (Figura 9 A).

Con un bisturí esterilizado se removieron las raíces a las plántulas y parte de la hoja, así como la semilla. Ya realizado el corte, se transfirieron las porciones de plántulas al medio MS para la proliferación (Figura 9 B), se sellaron y dejaron en incubadora (Figura 9 C).



Figura 9. Cambio de medio a las plántulas *S. formosissima* 2x de medio de germinación a medio de proliferación. A) Plántulas en placa de vidrio sin raíz, semilla y parte de hoja. B) Introducción de las plántulas cortadas a medio de proliferación. C) Plántulas ya cortadas en la incubadora.

A los 9 días del cambio de medio, se encontró que 1 de los 9 botes se había contaminado. Se detectó en el medio una mancha circular de color negro con una capa de color blanco (Figura 10 A) lo que indica una probable contaminación por hongo. Al igual que como se observa en la Figura 10 B, se presentaron raíces nuevas, pero aún faltaba la proliferación de hojas.

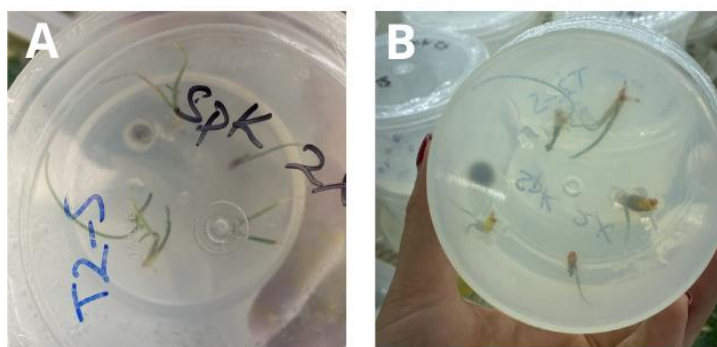


Figura 10. Contaminación por hongo en *S. formosissima* 2x. A) Vista desde la parte superior del contenedor. B) Vista desde la parte inferior del contenedor.

Después de 52 días desde que se realizó el cambio de medio, se ha observado un desarrollo extremadamente lento de las plántulas de *S. formosissima* 2x, tanto en el crecimiento de raíces como en la aparición de nuevas hojas. En el caso de *S. formosissima* 4x, se observó que comenzó a germinar después de 80 días desde la siembra, y a los 96 días ya había desarrollado hoja. Además, se extrajeron de la tierra las plantas de *S. formosissima* 5x que se encontraban creciendo en CIATEJ, lo que posibilitó el análisis de ploidía de estas muestras.

En campana de flujo laminar, se obtuvo una porción de hoja tanto de *S. formosissima* 2x como de 4x mediante el uso de un bisturí estéril y una placa de vidrio para corte. Posteriormente, se retiró una capa delgada de la parte abaxial de la hoja, la cual fue cuidadosamente colocada en un portaobjetos, sobre el cual se colocó una gota de solución de lugol y se cubrió con un cubreobjetos. Se empleó el microscopio DM5500B-CS para capturar imágenes que facilitarían el conteo de cloroplastos. Se tomaron 10 fotografías de diferentes estomas en cada nivel de ploidía y se calculó el promedio (Figura 11).

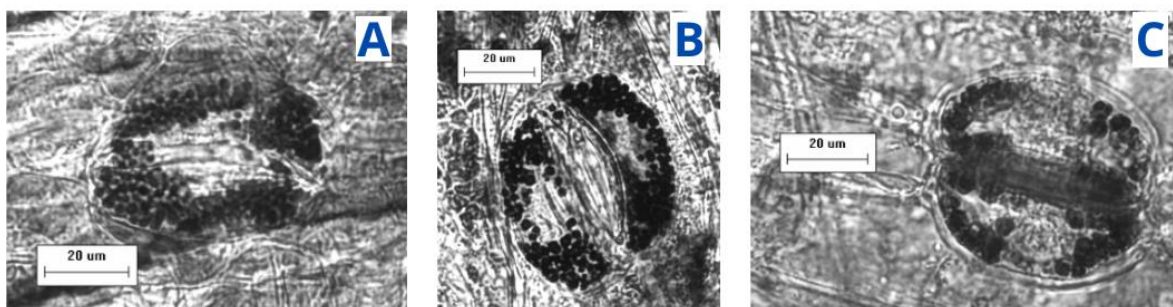


Figura 11. Cloroplastos en células guardas de estoma de *Sprekelia formosissima*. A) Ploidía 2x. B) Ploidía 4x. C) Ploidía 5x.

Después de realizar el conteo, se observó una relación inversa entre el nivel de ploidía y la cantidad de cloroplastos por estoma, tal como se detalla en la Tabla 7. Resulta esencial destacar que la longitud de los estomas se mantuvo dentro de un rango aproximado de 50 a 60 µm. Estos resultados no solo aportan valiosa información a nuestro conocimiento actual sobre las características de las plantas estudiadas, sino que también ofrecen una perspectiva relativa para futuras investigaciones.

Tabla 7. Relación del nivel de ploidía con el número de cloroplastos en células guardas de estomas en *Sprekelia formosissima*

Ploidía	Número de cloroplastos por célula guardas
2x	175
4x	143
5x	91

Experimento 3: Análisis citogenético de Tradescantia orchidophylla

Para abordar la estructura cromosómica de *T. orchidophylla*, se aplicó un enfoque citogenético, fundamental para comprender la evolución genómica. Los mapas citogenéticos

posibilitan la ubicación precisa de genes y marcadores en relación con elementos estructurales cromosómicos específicos, siendo esta información detallada esencial para la integración coherente de datos genéticos y la estructura física de los cromosomas. Además, la técnica de Hibridación *in Situ* Fluorescente (FISH por sus siglas en inglés) ha simplificado la generación de patrones de sondas específicas para distinguir cromosomas similares y llevar a cabo el mapeo [27].

En cuanto al proceso práctico, se realizó el procedimiento descrito en la investigación de Rodríguez-Domínguez *et al.* [28] y se hicieron algunas modificaciones debido a que las raíces de *T. orchidophylla* eran de mayor tamaño a las que se tratan en el artículo. Primeramente, se recolectaron las raíces de *T. orchidophylla* con ayuda de un bisturí, estas se cortaron de manera que quedaran de 1 cm de largo y se colocaron en una solución α -bromonaftaleno al 1% por 48 h. Una vez pasado el tiempo, se removieron de la solución y se preparó 3:1 metanol: ácido acético para sumergir las raíces, las cuales se dejaron a 4°C por 48h. Después, se colocaron las raíces en agua desionizada por 10 min, y de ahí se diseccionaron las raíces para cortar el fragmento que se encontrara de color transparente y descartarlo y quedarse solo con el fragmento de color blanco. Luego se procedió a transferir esos fragmentos a tubos Eppendorf con 200 μ L de buffer de citrato 10 mM, pH 4.5, por 10 min. Posteriormente, se descartó el buffer y se colocaron 50 μ L de mezcla enzimática que contiene 0.2% (p/v) de pectolisasa Y23, 0.2% (p/v) de celulasa RS y 0.2% (p/v) de citohelicasa en un buffer de citrato 10 mM, a pH 4.5. Las raíces con la mezcla enzimática se incubaron a 37°C por 2.5 h.

Se añadieron 600 μ L de agua destilada a los tubos Eppendorf que contenían las raíces de *T. orchidophylla* con la mezcla enzimática y se mezcló. Se programó la centrifuga a 10,000 rev/min, se colocó el tubo Eppendorf con raíces y uno con agua como contrapeso, por 45 segundos. Seguidamente, se removió el sobrenadante usando una micropipeta y se añadieron 600 μ L de metanol y se agitó la mezcla. Luego, se volvió a programar la centrifuga a 11,000 rev/min, se colocó el tubo Eppendorf con raíces y uno con agua como contrapeso, por 30 segundos. Se descartó el sobrenadante invirtiendo el tubo y se volvió a suspender el precipitado en 130 μ L de metanol y se guardó a 4°C.

En una campana de extracción, se colocaron 7 μL de suspensión celular de *T. orchidophylla* en un portaobjetos recubierto con una capa fina de ácido acético puro e inclinado en un ángulo de 45° . Seguidamente, se añadieron 2 gotas (100 μL) de ácido acético y se colocó boca abajo sobre el vapor de un baño de agua a 75°C por 5 segundos. Después se le colocó otra gota (50 μL) de ácido acético y se volvió a colocar boca abajo sobre el vapor por 5 segundos y se dejó secar.

Las laminillas de *T. orchidophylla* fueron teñidas con 50 μl de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Se colocaron las laminillas en oscuridad por 5 minutos y posteriormente, se analizaron los cromosomas con ayuda del sistema Leica DM5500B-CS spectral confocal TCS SPE RGBV y se tomaron fotografías utilizando el software LASX (Leica Microsystems).

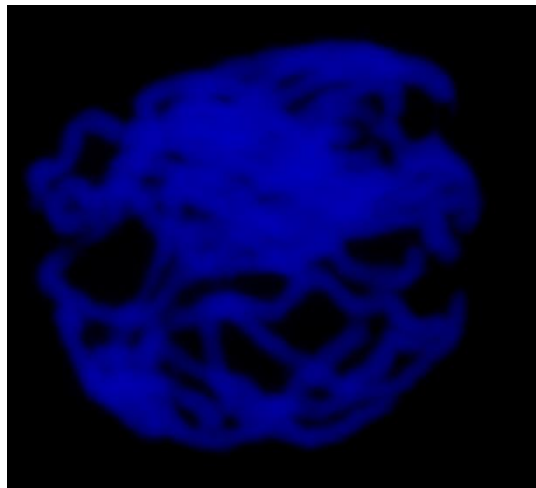


Figura 12. Cromosomas de *T. orchidophylla*

En la Figura 12, se presentan los cromosomas de *T. orchidophylla*, aunque su observación detallada se ve limitada. Esta limitación se debe a la notable longitud de los cromosomas, y a pesar de los esfuerzos realizados para separarlos y acortarlos, estos procedimientos no resultaron efectivos, complicando su apreciación en detalle y, por ende, impidiendo la realización del conteo cromosómico. En una fase ideal, se hubiera empleado la técnica FISH para llevar a cabo un mapeo cromosómico más preciso. Sin embargo, debido a restricciones de tiempo, no fue posible implementar esta fase del experimento.

Experimento 4: Micropropagación por explante de Tradescantia orchidophylla

La micropropagación es una herramienta eficaz para la rápida multiplicación y proporciona la posibilidad de producir un considerable número de plantas saludables y vigorosas en un periodo corto. Se utilizan explantes, que significa un pequeño tejido vegetal como segmento de tallo, hoja o raíz para iniciar la cultura de tejidos en un medio de cultivo[29].

Los medios de cultivo están diseñados para proveer nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas. Un medio debe incluir macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca y Mg) y microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe y Cl). La mayoría de los medios experimenta cierto grado de mejoría con la adición de vitaminas como tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, etc. Las fórmulas de medios basales (medio de cultivo con condiciones básicas para el crecimiento) se consideran estándar para proporcionar la cantidad esencial necesaria para los elementos requeridos. Difieren las fórmulas de estos medios en los compuestos utilizados para estimular la división celular como son 6-bencilaminopurina (BA), ácido indol-3-acético (AIA), ácido 2,2-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), benzotiazol-2-oxiacético (BTOA), etc. ya sea solos o en combinación para iniciar cultivos de callos de los tejidos de plantas [30].

Debido a que no se conoce el medio ideal para la micropropagación de *T. orchidophylla* se realizaron diferentes variaciones tanto con medio “Murashige y Skoog” (MS) y “Sheck y Hildebrandt” (SH). Ambos medios son ampliamente utilizados en la propagación y el cultivo de tejidos vegetales. Usualmente el medio MS se utiliza para la micropropagación y cultivo de tejidos vegetales mientras que el medio SH se utiliza para el cultivo de callos de mono y dicotiledóneas. Debido a que el medio SH tiene una composición química ligeramente diferente en términos de concentraciones de macro y micronutrientes en comparación con el medio MS, el crecimiento y desarrollo de ciertos cultivos puede variar [31].

Se trabajó con medio MS Stock que tiene una composición química equilibrada y precisa en términos de macro y micronutrientes, los cuales se pueden apreciar en la Tabla 8 [32]. Esta combinación equilibrada proporciona a las plantas una nutrición adecuada para su crecimiento y desarrollo. En el presente PAP el medio MS Stock ya se encontraba preparado con macroelementos y microelementos por lo que solo se agregaron las vitaminas y el hierro

de ser necesario. Debido a que no se conoce el medio ideal para la micropropagación de la especie se prepararon varios medios haciendo variaciones en los componentes (Tabla 9).

Tabla 8. Composición del MS Stock [32]

Compuesto	Concentración (mg/L)
Macroelementos	
Fosfato de potasio	170
Nitrato de potasio	1900
Sulfato de magnesio	180.7
Nitrato de amonio	1650
Cloruro de calcio anhidros	332.2
Microelementos	
Ácido bórico	6.20
Cloruro de cobalto	0.03
Sulfato cúprico	0.03
Sulfato de manganeso	16.9
Yoduro de potasio	0.83
Molibdato de sodio	0.25
Sulfato de zinc	8.60
Hierro	
Sulfato ferroso	27.80
Etilendiaminotetraacetato de sodio	37.26
Vitaminas	
Tiamina HCl	0.10
Piridoxina HCl	0.50
Ácido nicotínico	0.50
Myo-inositol	100
Glicina	2.00

Tabla 9. Medios de cultivo utilizados para la micropropagación de *Tradescantia orchidophylla*

Número del medio	Descripción
1	Medio MS Stock adicionado con vitaminas y PPM.
2	Medio MS Stock adicionado con fitohormonas (BA y AIA).
3	Medio MS Stock adicionado con fitohormonas y nanopartículas de plata.
4	Medio SH adicionado con fitohormonas (2,4-D, BA y ANA).
5	Medio SH adicionado con fitohormonas y nanopartículas de plata

Para elaborar el medio número 1, se utilizaron dos concentraciones de medio MS stock con el propósito de comparar su comportamiento. Las concentraciones fueron 100 y 50 mL/L (Tabla 10) y a cada una se le agregaron vitaminas, sacarosa, antibiótico PPM (Plant Preservative Mixture por sus siglas en inglés) y agar, asimismo se ajustó el pH. La preparación del medio se realizó en el siguiente orden: primero se colocó el medio MS en un

vaso de precipitado sobre una plancha de agitación, después se le agregó la sacarosa y las vitaminas. De ahí se aforó a 1L y se ajustó el pH a 5.8. Seguidamente, en campana de flujo laminar, se agregó el PPM y el agar. A continuación, se colocó el recipiente en el microondas para disolver el agar. Cuando el agar ya se encontraba disuelto, se vertió el contenido en botes de plásticos y se esterilizaron en autoclave a las condiciones mencionadas anteriormente.

Tabla 10. Composición de los medios MS

Compuesto	MS 1	MS 2	MS 3	MS 4
Medio MS Stock	100 mL/L	50 mL/L	100 mL/L	100 mL/L
Sacarosa	15 g/L	15 g/L	15 g/L	15 g/L
Ácido nicotínico	0.25 mg/L	0.25 mg/L	0.0 mg/L	0.0 mg/L
Piridoxina	0.25 mg/L	0.25 mg/L	0.0 mg/L	0.0 mg/L
Tiamina	0.50 mg/L	0.50 mg/L	0.0 mg/L	0.0 mg/L
Mioinocitol	50 mg/L	50 mg/L	0 mg/L	0 mg/L
Glicina	1 mg/L	1 mg/L	0 mg/L	0 mg/L
PPM ^a	1 mL/L	1 mL/L	0 mL/L	0 mL/L
Agar	8 g/L	8 g/L	8 g/L	8 g/L
pH	5.8 ± 0.02	5.8 ± 0.02	5.8 ± 0.02	5.8 ± 0.02
BA ^b	0.0 mg/L	0.0 mg/L	0.08 mg/L	1 mL/L
AIA ^c	0.0 mg/L	0.0 mg/L	0.4 mg/L	0.25 mg/L
Nanopartículas de plata	0.0 mL/L	0.0 mL/L	0.0 mL/L	10 mL/L
Bactericida b-xitral	0 µL/L	0 µL/L	0 µL/L	1000 µL/L (1%)

a: Plant Preservative Mixture

b: 6-Benciloaminopurina

c: Ácido indol-3-acético

Como tercer medio (MS3), se agregó al medio hormonas vegetales (citocinas: BA y auxinas: AIA), sacarosa, se ajustó el pH y se agregó agar (Tabla 10 MS3). Para la preparación, primero se disolvió la sacarosa en el medio en una placa magnética, luego se agregaron las hormonas y se aforó a 2 L. Posteriormente se ajustó el pH, se agregó el agar y se disolvió para después vaciar en el medio en 40 botes que se esterilizaron en autoclave según las condiciones previamente mencionadas.

Como cuarto medio (MS4), se decidió realizar un medio para utilizar como explante los bulbos en vez de las hojas de la planta. En este caso se agregaron al medio: fitohormonas, sacarosa y nanopartículas de plata, así como se ajustó el pH (Tabla 10 MS4). Para la preparación, primero se disolvió la sacarosa en el medio en una placa magnética, luego se agregaron las hormonas y se aforó a 0.5 L. Posteriormente se ajustó el pH, y bajo la campana de flujo laminar, se agregaron las nanopartículas para después adicionar el agar, disolver y

verter en 10 botes que se esterilizaron en autoclave como se mencionó anteriormente. En este experimento, se decidió utilizar soluciones que combaten microorganismos como son las nanopartículas de plata 20 nm (Figura 13 A) y el agente desinfectante b-xitral (Figura 13 B) debido a que este explante al estar en contacto con la tierra es más difícil desinfectar y los reactivos cuentan con propiedades antibacterianas y antimicrobianas que ayudan a combatir la contaminación del medio.

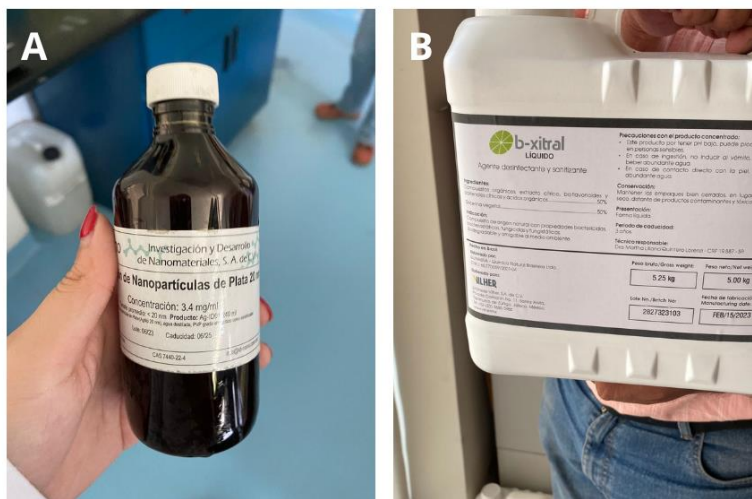


Figura 13. Soluciones desinfectantes que se agregan directamente al medio. A) Solución de nanopartículas de plata. B) Agente desinfectante b-xitral

Para poder realizar la siembra de explantes en los medios preparados previamente, fue necesario desinfectarlos, y más importante aún en el caso de *Tradescantia orchidophylla* debido a que al ser una planta bulbosa sus hojas están al ras de la tierra (Figura 14 A) y el bulbo bajo tierra (Figura 14 B) por lo que la desinfección es esencial para mantener un ambiente de cultivo libre de contaminantes microbianos y permitir el crecimiento adecuado. Para los medios MS1, MS2, MS4 se utilizaron hojas (Figura 15 A) como explantes, mientras que para el medio MS3 se utilizaron bulbos (Figura 15 B).



Figura 14. *Tradescantia orchidophylla* en invernadero. A) *T. orchidophylla* en maceta. B) *T. orchidophylla* fuera de la maceta.



Figura 15. Explantes de *Tradescantia orchidophylla*. A) Hojas como explante. B) Bulbos como explante.

Para la desinfección de hojas y bulbos de *T. orchidophylla* se siguió la metodología descrita en desinfección de material vegetal mencionado anteriormente. Lo único que se varió es que en el caso de los bulbos, se adicionó el fungicida Alliete (1g/L) y, en lugar de permanecer 24 horas en bactericida y fungicida como las hojas, los bulbos duraron 48 horas.

En el caso de los explantes de hojas de los medio MS1, MS2 y MS4, después de los enjuagues se prosiguió a cortar la hoja en un vidrio de corte con ayuda de un bisturí (Figura 16 A) y sembrar (Figura 16 B). Se aseguró que cada vez que se cortara una nueva hoja se desinfectara la placa de vidrio flameándola, y se flamearan también las pinzas y bisturí cada que se cambiara de hoja.

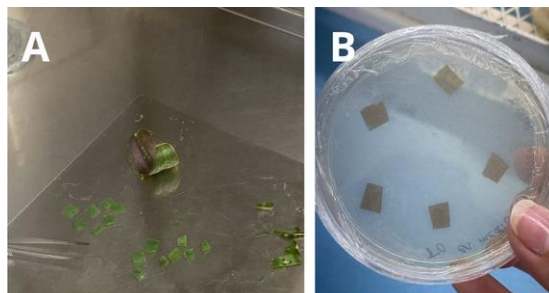


Figura 16. Corte y siembra de explante de hojas. A) Corte de explantes de hoja de alrededor 1 cm². B) Siembra de explantes en medio.

En el caso del medio MS3, al tratarse con bulbos se decidió hacer un subexperimento donde en 10 frascos de vidrio se colocó el medio normal (Figura 17 A) y en otros 10 frascos antes de que gelificara se agregó el bactericida b-xitral al 1% (Figura 17 B) para determinar si había un cambio en el medio. Después de realizar los enjuagues con agua destilada, se prosiguió a cortar el bulbo en tres partes a lo largo y se sembraron en los medios, asegurando flamear cada cambio de explante.

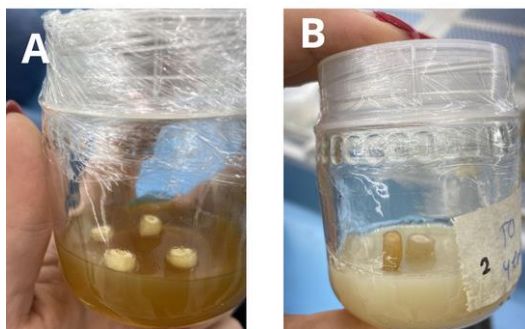


Figura 17. Siembra de explante de bulbo. A) Siembra en medio sin bactericida b-xitral. B) Siembra en medio con bactericida b-xitral.

En el caso de los medios MS1 y MS2, en los cuales se empleó medio MS suplementado con vitaminas y PPM, no se observaron diferencias al utilizar concentraciones de 100 mL/L (Figura 18 A) y 50 mL/L (Figura 18 B). Ambas concentraciones, a los 8 días de ser sembrados con explantes (hojas) empezaron a presentar contaminación por hongo. Después de 52 días, se encontró que de los 20 botes con medio MS1 que contenían 80 hojas, solo 8 no mostraron contaminación, aunque tampoco se formó callo. De manera similar, en los 20 botes con medio MS2, que contenían 80 hojas, solo 12 no presentaron contaminación, sin embargo, tampoco se formó callo.

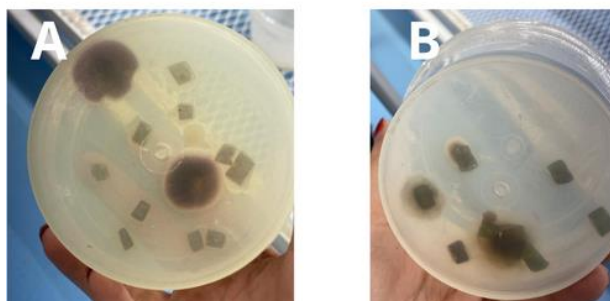


Figura 18. Contaminación del medio MS con vitaminas y PPM sembrado con explantes de hojas. A) Medio MS1 B) Medio MS2.

En el medio 3 (MS3), en el cual se utilizó medio MS adicionado con fitohormonas BA y AIA y sembrado con explantes, se observó el mismo comportamiento que en los medios anteriores. A los 8 días ya se encontraban los explantes contaminados por hongo, solo que a diferencia de MS1 y MS2, este tuvo una mayor contaminación por lo que a los 52 días se encontró que los 20 botes fueron contaminados por hongo (Figura 19).

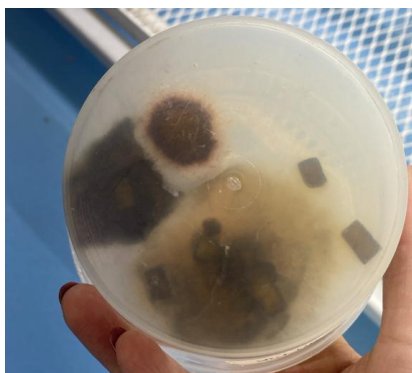


Figura 19. Contaminación de medio MS3: Medio MS con fitohormonas BA y AIA sembrado con explantes de hojas.

Se optó en el medio 4 (MS4), medio MS con fitohormonas y nanopartículas de plata, realizar un ensayo adicional para determinar el efecto del bactericida b-xitral en el crecimiento de *T. orchidophylla*. Por lo tanto, se prepararon 10 botes de dicho medio con el bactericida y 10 botes sin el bactericida. Después de 8 días, todos los frascos con medio sin bactericida se contaminaron mientras que de los frascos de medio con bactericida solo se contaminaron 2 botes de 10. Además, como se observa en la Figura 20, es mucha la diferencia del tamaño de hongo que creció en el mismo lapso de tiempo en el medio sin (Figura 20 A) contra el medio con b-xitral (Figura 20 B). Después de 42 días en la incubadora, 8 de los botes con explante de bulbo con bactericida en el medio se quedaron libres de contaminación, pero no se observó ningún cambio del día 0 al día 42.

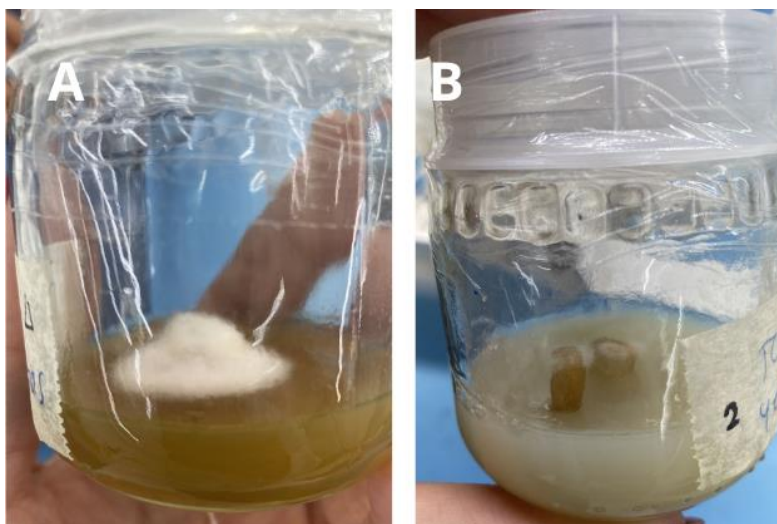


Figura 20. Contaminación de medio MS4: Medio MS con fitohormonas y nanopartículas de plata sembrado con explantes de bulbo. A) Medio sin bactericida b-xitral. B) Medio con bactericida b-xitral.

Después, se decidió utilizar el medio SH debido a que es eficaz para la propagación y cultivo de tejidos de ciertas especies. Se ha visto que algunas especies responden mejor al medio SH que al MS debido a que tiene menor cantidad de sales y nutrientes [32]. Debido a que para el presente PAP no se tenía preparada la solución del medio SH, se realizó desde cero siguiendo la lista de compuestos en la Tabla 11 para 1.0 L. Se prepararon por separado las soluciones stock de medio SH, vitaminas y microelementos. Es importante recalcar que para los medios SH se utilizaron explante de hoja de *Tradescantia orchidophylla*.

Tabla 11. Composición del medio de cultivo SH [32]

Compuesto	Concentración (mg/L)
Macroelementos	
Nitrato de potasio	2500.0
Sulfato de magnesio	195.4
Cloruro de calcio	151.0
Fosfato monobásico de amonio	300.0
Microelementos	
Ácido bórico	5.0
Cloruro de cobalto	0.1
Sulfato cúprico	0.2
Yoduro de potasio	1.0
Molibdato de sodio	0.1
Sulfato de zinc	1.0
Hierro	
Sulfato ferroso	15.0
Etilendiaminotetraacetato de sodio	20.0
Vitaminas	
Tiamina HCl	0.50

Piridoxina HCl	0.05
Ácido nicotínico	0.50
Myo-inositol	100.00

Como quinto medio utilizado para la micrpropagación de *T. orchidophylla* se utilizó medio SH al que se le agregaron las hormonas, la sacarosa y el agar, así como se ajustó el pH (Tabla 12 SH1). La preparación del medio siguió con el orden de colocar el medio SH en un vaso de precipitado sobre una plancha de agitación, después se le agregaron la sacarosa y las hormonas. De ahí se aforó a 250 mL y se ajustó el pH a 5.8. Seguidamente, se agregó el agar, se disolvió en el microondas y se esterilizó en la autoclave. Una vez esterilizado el medio, se le agregó, dentro de campana de flujo laminar, el bactericida b-xitral, se vertió en 12 cajas Petri, y se sellaron.

Tabla 12. Composición de medio para organogénesis con medio SH

Compuestos	SH 1	SH 2
Medio SH	250 mL/L	250 mL/L
Sacarosa	30 g/L	30 g/L
BA ^a	2 mg/L	2 mg/L
2,4-D ^b	3 mg/L	3 mg/L
ANA ^c	2 mg/L	2 mg/L
Agar	8 g/L	8 g/L
pH	5.8 ± 0.02	5.8 ± 0.02
Bactericida b-xitral	0.5%	1%
Nanopartículas de plata	0 mL/L	10 mL/L

a: 6-Bencilaminopurina

b: 2,4-Diclorofenoxiacético

c: Ácido naftalenoacético

Como sexto medio (SH2), al medio SH se le agregaron hormonas y bactericida b-xitral. Se aforó a 250 mL, se ajustó el pH y en campana de flujo laminar se agregaron nanopartículas de plata al medio (Tabla 12 SH2). Esto para lograr un nivel más alto de desinfección al medio tal como se realizó en el medio MS4.

En el caso del medio SH1, medio SH adicionado con fitohormonas, además de los enjuagues realizados, se realizó un enjuague extra utilizando el bactericida b-xitral al 0.5%. Después se siguieron los pasos igual que el medio MS1 para sembrar. Una vez sembrados en las 11 cajas Petri se colocaron en la incubadora, pero se colocaron en una caja para que estuvieran en oscuridad por 2 días. Transcurriendo esos días, se sacaron de la caja y se expusieron a la luz de la incubadora. Sin embargo, al día 3 se empezó a observar una contaminación en los explantes (Figura 21 A), por lo que se decidió cortar en campana de flujo laminar (con el

flujo laminar apagado) el pedazo de agar donde se encontraba la hoja contaminada esperando que evitara la contaminación de toda la Placa. Sin embargo, 5 días después de cortar el agar se encontró que la contaminación por hongo se esparció a las demás hojas en la caja Petri (Figura 21 B). Obteniendo de un total de 55 explantes de hojas, 14 no contaminadas.

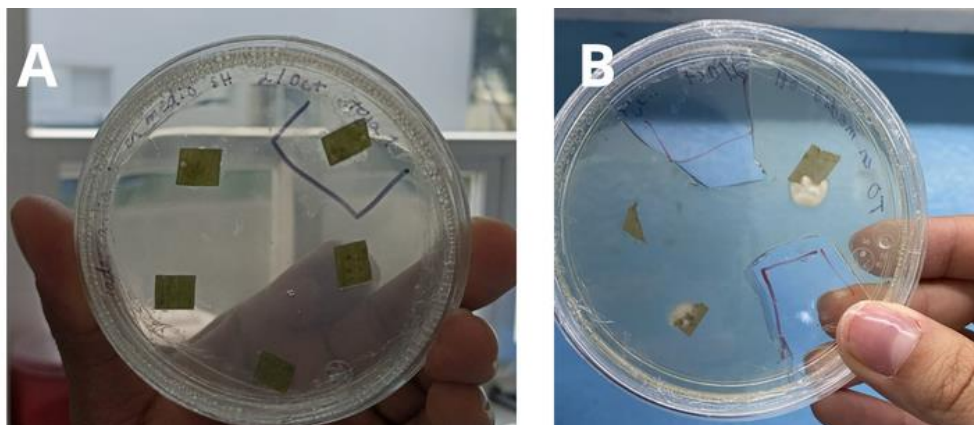


Figura 21. Contaminación de medio SH1: Medio SH con fitohormonas 2,4-D, BA y ANA, sembrado con explante de hoja. A) Día 3 de siembra. B) Día 8 de siembra.

El caso del medio SH2, se distinguió de los medios anteriores porque no se desinfectaron las hojas de *T. orchidophylla* con Bactrol y Captan antes de realizar los lavados con agua, cloro y etanol al 70% descritos previamente. Consecuentemente, solo se introdujeron las hojas de *T. orchidophylla* extraídas del invernadero a la campana de flujo laminar, donde se realizaron lavados con jabón comercial. Después se vertió y se agregó cloro al 3% por 10 min, se retiró el líquido y se realizó un enjuague con cloruro de mercurio al 0.1% por 10 min (que sustituye al Bactrol y Captan). Una vez pasado el tiempo, se realizaron 3 enjuagues de agua destilada estéril cada uno por 3 minutos. Después se cortó la hoja en placa de vidrio con ayuda de bisturí y pinzas como en los experimentos anteriores y se sembraron en 11 cajas Petri. De las cuales, después de 9 días solo 2 explantes se contaminaron, siendo el mejor medio hasta ahora. Sin embargo, las demás hojas que se encuentran libres de contaminación empezaron a tomar una coloración más amarillenta (Figura 22).

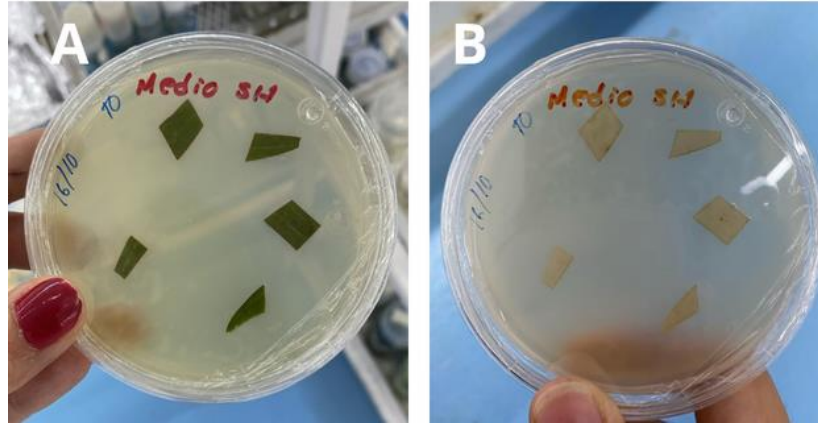


Figura 22. Medio SH2: Medio SH con fitohormonas, nanopartículas de plata y bactericida b-xitral, sembrado con explante de hoja. A) Día 0 de siembra. B) Día 9 de siembra.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Experimento 1: Germinación de semillas de Tigridia pavonia

El experimento se centra en los impactos de distintos tratamientos de luz en el proceso de germinación de semillas de *T. pavonia* y *S. lycopersicum*. La eficacia de la germinación de semillas se ve afectada por la calidad de luz, considerando aspectos como longitud de onda y duración de la exposición. En el caso de *S. lycopersicum* se observó que la máxima tasa de germinación (30%) se logró con la luz azul, seguida de naranja (20%), verde (10%), amarillo (10%), morado (10%) y el grupo control (10%). En contraste, el color rojo mostró ser el menos efectivo, ya que no generó ninguna germinación en el lapso de 24 días (Tabla 5).

Estos resultados no concuerdan con investigaciones previas, como la llevada a cabo por Abdullateef y Osman [33], quienes concluyeron que la luz roja (660 nm) ejercía una influencia positiva en la germinación de semillas *Stevia rebaudiana*. Asimismo, los resultados de este PAP contradicen los resultados obtenidos por Lal y Sachan [34], quienes encontraron que la luz roja también resultaba ser la más efectiva, logrando un 98% de germinación en 84 horas de exposición en *Vigna unguiculata*.

Se ha documentado previamente por Jala [35], en el caso de *Nepenthes mirabilis*, que las semillas expuestas a la luz blanca y roja exhibieron germinación más temprana. A pesar de este patrón no concordar con *S. lycopersicum*, sí se asemeja a lo observado en *T. pavonia* donde las semillas exhibieron tasas de germinación al ser expuestas a luz verde (40%), luz

roja (30%) y luz blanca (control) (20%), mientras que los demás colores no mostraron germinación en el lapso de 24 días (Tabla 5).

Esto indica que *S. lycopersicum* no es la planta modelo ideal para representar el efecto de las distintas longitudes de onda de luz en la germinación de semillas de *T. pavonia* debido a que mostraron resultados muy distintos. Esto puede deberse a que el *S. lycopersicum* y *T. pavonia* son plantas muy diferentes, tanto en términos de su clasificación botánica como en sus características de crecimiento y reproducción. *S. lycopersicum* tiene un ciclo de vida relativamente corto y se reproduce a partir de semillas, mientras que *T. pavonia* tiene ciclos de vida más largos y se reproduce tanto por semillas como por bulbos. Dado que estas dos plantas tienen diferencias significativas en su biología y ciclo de vida, el jitomate no sería una elección adecuada como planta modelo para representar la germinación de *Tigridia pavonia*. Sería más preciso seleccionar una planta que sea más similar en términos de estructura y proceso de crecimiento para representar adecuadamente la germinación de *Tigridia pavonia*. Se recomienda la realización de estudios adicionales que se centren específicamente en plantas de la familia *Iridaceae*, a la cual pertenece *Tigridia*. Esto permitiría obtener una comprensión más detallada de cómo los diferentes colores de luz afectan el proceso de germinación en este grupo de plantas en particular.

Experimento 2: Evaluación del nivel de ploidía en Sprekelia formosissima

Las alteraciones en el nivel de ploidía, según Wendel [36], ofrecen mayor flexibilidad en los procesos y cambios químicos, fisiológicos y morfológicos, facilitando una adaptación más exitosa y competitividad con otras plantas en su entorno. La ploidía se refiere a la cantidad de cromosomas en las células somáticas, y en las plantas, se espera variación en este número en relación con el material genético presente. En el caso de *Sprekelia formosissima*, se identificó una correlación negativa entre el nivel de ploidía y la cantidad de cloroplastos por célula guarda en los estomas, indicando que las plantas con un menor número de cloroplastos presentan un incremento en la ploidía.

En el estudio realizado por Soto [37], se encontró que en *Solanum tuberosum* hay una correlación positiva entre el nivel de ploidía y la cantidad de cloroplastos por célula guarda,

donde entre mayor ploidía, mayor número de cloroplastos por célula guarda. Esto coincide con el estudio realizado por Krishnaswami y Andal [38] en *Gossypium spp.*, donde se concluyó que las plantas presentaban una correlación positiva entre el nivel de ploidía y el número de cloroplasto. Estas observaciones de otras plantas indican que, aunque vinculadas a otras especies, respaldan que con el aumento de los niveles de ploidía se produce un cambio en el número de cloroplastos.

Es relevante señalar que esta relación no fue identificada en el presente estudio ni en el estudio realizado por Castañeda-Nava *et al.* [26], donde se encontró una correlación negativa en *Dioscorea spp.* Es fundamental tener en cuenta que la poliploidía puede afectar el crecimiento y desarrollo de las plantas, y las plantas con mayor ploidía se han utilizado como una estrategia eficaz para incrementar la producción de compuestos con funciones de metabolitos secundarios, los cuales mejoran las características morfológicas. Chong y Ozias-Akins [39], consideran que el conteo de cloroplastos en células meristemáticas es un método claro y definitivo para la determinación de número de cromosomas y nivel de ploidía de una especie.

Experimento 3: Análisis citogenético de Tradescantia orchidophylla

La preparación de cromosomas es un factor clave en experimentos FISH y para poder cariotipar. Debido a que cada especie vegetal presenta variaciones en los tamaños cromosómicos y componentes intracelulares, puede influir en la técnica para preparar cromosomas [40]. Al seguir la metodología descrita por Rodríguez-Domínguez *et al* [28], se obtuvieron cromosomas muy juntos, ya que en el caso de cromosomas numerosos de gran tamaño tienden a solaparse complicando el recuento.

Se ha encontrado en investigaciones que el uso de una solución hipotónica es fundamental para obtener cromosomas dispersos de alta calidad y se ha sido utilizado en la citogenética vegetal [41]. Sin embargo, en el presente PAP se omitió tratamiento hipotónico debido a que en trabajos anteriores del Dr. Rodríguez [28] [42] donde se realizó esta metodología, no fue utilizado el tratamiento y se pudo obtener buena dispersión cromosómica. Sin embargo, la

omisión de un tratamiento hipotónico pudo ser un factor que influyera en los resultados de este experimento.

La evaporación del metanol en el procedimiento para el análisis citogenético permite que el ácido acético reaccione con el agua y las proteínas celulares, provocando el hinchamiento de la célula y contribuyendo al aumento de la dispersión cromosómica. Además, el vapor generado por un baño de agua proporciona la humedad y temperatura necesarias para la dispersión cromosómica en especies vegetales [22]. Siguiendo el protocolo, después del baño de agua, se agrega nuevamente ácido acético para garantizar la dispersión cromosómica y obtener metafase de alta calidad. Es relevante señalar que algunos investigadores han reportado que el ácido puede afectar la estructura y la conformación del ADN [43].

Experimento 4: Micropropagación por explante de Tradescantia orchidophylla

En el año 1897, *Tradescantia orchidophylla* fue descubierta y se encuentra exclusivamente en los estados de Colima, Guerrero, Jalisco y Michoacán [44]. A pesar de su antigüedad y la singularidad de su distribución geográfica, no se han llevado a cabo investigaciones orientadas al mejoramiento genético o la comercialización de esta especie desde su descubrimiento. Dada su particularidad de florecer únicamente una vez al año, durante el verano, se vuelve esencial encontrar el medio ideal para su propagación *in vitro*. Esto no solo permitiría un estudio más detallado de la planta, sino también su reproducción masiva, contribuyendo así a su conservación y posiblemente a su reintroducción en ambientes controlados.

En el presente PAP, se exploraron 5 medios distintos para la propagación *Tradescantia orchidophylla* a través de la organogénesis indirecta. No obstante, no fue posible desarrollar el medio óptimo debido a la limitación de material vegetal para continuar con experimentos adicionales. En contraste, en un estudio previo llevado a cabo por Scaramuzzi *et al.* [45], se investigaron *Tradescantia fluminensis* y *Tradescantia pallida* utilizando tres medios diferentes (MS basal, MS con AIA, MS con AIA y BA). Aunque no se observó la formación de callos en ninguno de los medios, se obtuvieron yemas, una respuesta que no se replicó en nuestro caso. Cabe destacar que el medio más eficaz en ese estudio fue el MS basal (sin

fitohormonas), generando explantes con un mayor porcentaje de formación de yemas. Es relevante señalar que la divergencia entre el trabajo de Scaramuzzi *et al.* [45] y el presente estudio radica en el tipo de explante utilizado, ya que en nuestro caso se utilizaron hojas a diferencia del estudio donde utilizaron tallos. Esta diferencia en el material vegetal puede influir significativamente en los resultados obtenidos debido a las variaciones inherentes en la respuesta de diferentes partes de la planta a los medios de cultivo. Debido a que *Tradescantia orchidophylla* carece de tallos, se optó por utilizar hojas y bulbos como explante.

Los resultados de la experimentación que el empleo del medio SH con fitohormonas, nanopartículas de plata y bactericida b-xitral permitió tener de poca a nula contaminación en los explantes de *T. orchidophylla*, sin embargo, las hojas se volvían de color amarillento. La decoloración de las hojas puede atribuirse a diversos factores. Uno de ellos podría ser el desequilibrio en la composición de nutrientes en el medio de cultivo. Es importante recalcar que la formación de callo está fuertemente influenciada por el tipo de explante y la presencia de hormonas [46], por lo que podría ser necesario ajustar las concentraciones de hormonas para observar respuestas diferentes.

En el estudio de Aguilera-Arango *et al.*[47], se encontró que adicionar carbón activado al medio favorece la formación de callos y evita la oxidación de tejidos. Según Steinmacher *et al.* [48], uno de los desafíos más recurrentes en la propagación *in vitro* es la oxidación de tejidos, lo que representa una limitación significativa para el establecimiento de un protocolo efectivo de regeneración vegetativa. Con el propósito de mitigar los problemas de oxidación *in vitro*, se suele incorporar el carbón activado al medio, buscando así reducir o eliminar compuestos indeseables y mejorar las respuestas morfogénicas de los explantes, por lo que se podría adicionar al medio para mejorar la callogénesis.

1.7. Bibliografía y otros recursos

- [1] CIATEJ, “Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible.”
- [2] CIATEJ, “Biotecnología Vegetal.”
- [3] F. A. Guerrero-Valencia, J. L. Rodríguez-de la O, M. D. J. Juárez-Hernández, J. Ayala-Arreola, and G. Ramírez-González, “Micropropagación del lirio amazónico

- (*Eucharis grandiflora* Planch. & Linden) mediante organogénesis directa,” *Polibotanica*, vol. 0, no. 51, Jan. 2021, doi: 10.18387/polibotanica.51.9.
- [4] S. Bhatia and K. Sharma, “Micropropagation,” in *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences*, Elsevier, 2015, pp. 361–368. doi: 10.1016/B978-0-12-802221-4.00011-X.
- [5] H. Troiani, A. Prina, W. Muiño, M. Tamame, and L. Beinticenco, “Organización de la plantas vasculares,” in *Botánica, morfología, taxonomía y fitogeografía*, 1st ed., M. Carballo, Ed., La Pampa: EdUNLPam, 2017, pp. 11–16.
- [6] A. Villalobos and T. Thrope, “Micropropagación: conceptos, metodología y resultados,” in *Cultivo de tejidos en la agricultura*, Cali, Colombia: CIAT, 1993, pp. 127–141.
- [7] P. Gupta, “Plant cytogenetics: A re-birth in twenty-first century,” *Indian J. Crop Science*, vol. 1, no. 2, pp. 1–7, 2006.
- [8] R. A. Volkov, N. Y. Komarova, and V. Hemleben, “Ribosomal DNA in plant hybrids: Inheritance, rearrangement, expression,” *Syst Biodivers*, vol. 5, no. 3, pp. 261–276, Aug. 2007, doi: 10.1017/S1477200007002447.
- [9] T. Dinkova, M. Ramos-Leal, and R. Maribona, “Genes ribosomales en plantas,” *Bioteconología Aplicada*, vol. 8, no. 1, pp. 1–7, 1991.
- [10] J. A. Castro, E. J. Araque, J. E. Pacheco, and J. C. Pacheco, “Micropropagación y determinación del número cromosómico de *Puya trianae* con fines de conservación y uso ornamental,” *Rev Peru Biol*, vol. 25, no. 3, pp. 267–280, Sep. 2018, doi: 10.15381/rpb.v25i3.15210.
- [11] Y. Mayett-Moreno, J. Popp, M. Sabogal-Salamanca, S. Rodríguez-Piñeros, E. Salomé-Castañeda, and D. Flores-Alonso, “Consumers’ and Retailers’ Attitudes Towards a Mexican Native Species of Aztec Lily as an Ornamental Plant,” *Sustainability*, vol. 10, no. 1, p. 224, Jan. 2018, doi: 10.3390/su10010224.
- [12] M. Gallegos, “Las plantas medicinales: usos y efectos en el estado de salud de la población rural de Babahoyo – Ecuador –,” Doctorado, UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, Lima, 2017.
- [13] P. Seemann and N. Andrade, “Cultivo y manejo de plantas bulbosas ornamentales,” 1999.
- [14] M. Cáarez, M. Andrade, A. Villegas, I. Alia, O. Villegas, and V. López, “PROPAGACIÓN in vitro DE *Sprekelia formosissima* Herbert., PLANTA SILVESTRE CON POTENCIAL ORNAMENTAL,” *Rev. Fitotec. Mex.*, vol. 33, no. 3, 2010.
- [15] Gross Consultores Asociados, “Estudio: Análisis del sector bulbos para flores y estudio de mercado de las flores de corte,” 2002.
- [16] J. Herrera, “La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales,” *Agronomía Colombia*, vol. 25, no. 1, 2007.
- [17] L. Martínez and J. Gago, “Micropropagación vegetal,” *Rebigo*, vol. 3, no. 64, pp. 59–65, 2008.
- [18] Y. Guan, S.-G. Li, X.-F. Fan, and Z.-H. Su, “Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants.,” *Front Plant Sci*, vol. 07, Jun. 2016, doi: 10.3389/fpls.2016.00938.
- [19] F. Ngezahayo and B. Liu, “Axillary Bud Proliferation Approach for Plant Biodiversity Conservation and Restoration,” *International Journal of Biodiversity*, vol. 2014, pp. 1–9, Apr. 2014, doi: 10.1155/2014/727025.

- [20] T. Bull and R. Michelmore, “Molecular Determinants of in vitro Plant Regeneration: Prospects for Enhanced Manipulation of Lettuce (*Lactuca sativa* L.),” *Front Plant Sci*, vol. 13, May 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.888425.
- [21] C. R. De Carvalho and L. S. Saraiva, “An Air Drying Technique for Maize Chromosomes without Enzymatic Maceration,” *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 68, no. 3, pp. 142–145, Jan. 1993, doi: 10.3109/10520299309104684.
- [22] I. Kirov, M. Divashuk, K. Van Laere, A. Soloviev, and L. Khrustaleva, “An easy ‘SteamDrop’ method for high quality plant chromosome preparation,” *Mol Cytogenet*, vol. 7, no. 1, p. 21, Dec. 2014, doi: 10.1186/1755-8166-7-21.
- [23] N. Schmidt, B. Weber, J. Klekar, S. Liedtke, S. Breitenbach, and T. Heitkam, “Preparation of Mitotic Chromosomes with the Dropping Technique,” 2023, pp. 151–162. doi: 10.1007/978-1-0716-3226-0_8.
- [24] J. Serrano, “Efecto de dos compuestos orgánicos de estaño fluorescentes en un modelo in vitro de melanoma murino,” Maestría, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apodaca.
- [25] I. Auliya, L. Hapsari, and R. Azrianingsih, “Comparative study of leaf stomata profiles among different ploidy levels and genomic groups of bananas (*Musa* L.),” *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*, vol. 391, no. 1, p. 012037, Dec. 2019, doi: 10.1088/1755-1315/391/1/012037.
- [26] J. J. Castañeda-Nava, F. Santacruz-Ruvalcaba, R. Barba-González, J. D. J. Sánchez González, and L. De la Cruz Larios, “EVALUATING THE CORRELATION OF PLOIDY LEVEL, LEAF SIZE, STOMATA CHARACTERISTICS AND TUBER WEIGHT IN *Dioscorea* spp. POPULATIONS FROM JALISCO, MÉXICO,” *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 26, no. 2, May 2023, doi: 10.56369/tsaes.4720.
- [27] J. Herrera, “La citogenética molecular y su aplicación en el estudio de los genomas vegetales,” *Agron. Colomb.*, vol. 25, no. 1, pp. 26–35, 2007.
- [28] J. Rodríguez-Domínguez, L. Ríos-Lara, E. Tapia-Campos, and R. Barba-Gonzalez, “An improved technique for obtaining well-spread metaphases from plants with numerous large chromosomes,” *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 92, no. 3, pp. 159–166, Apr. 2017, doi: 10.1080/10520295.2017.1288927.
- [29] M. Falcón, “MICROPROPAGACIÓN DE HÍBRIDOS INTERESPECÍFICOS DEL GÉNERO *EUSTOMA* spp., UTILIZANDO DIVERSAS TÉCNICAS DE CULTIVO IN VITRO,” Maestría, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C., Guadalajara, Jalisco, 2018.
- [30] A. Krikorian, “Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación,” in *Cultivos de tejidos en la agricultura*, Cali, Colombia: CIAT, 1993, pp. 41–59.
- [31] Universidad Abierta y a Distancia de México, “Cultivo de tejidos vegetales I,” *UI: Generalidades*. pp. 1–42. Accessed: Oct. 19, 2023. [Online]. Available: https://dmd.unadmexico.mx/contenidos/DCSBA/BLOQUE2/BI/06/BCTV1/unidad_01/descargables/BCTV1_U1_Contenido.pdf
- [32] A. Andrade, L. Gómez, Y. Torres, and G. Aguilera-Arango, “EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL ESTABLECIMIENTO, MULTIPLICACIÓN Y ENRAIZAMIENTO in vitro DE MORA (*Rubus glaucus* Benth.),” *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, vol. 37, no. 2, pp. 117–127, Mar. 2021, doi: 10.29393/CHJAAS37-14EMAG40014.

- [33] R. Abdullateef and B. Osman, "Effects of Visible Light Wavelengths on Seed Germinability in *Stevia Rebaudiana* Bertoni," *Int J Biol*, vol. 3, no. 4, Sep. 2011, doi: 10.5539/ijb.v3n4p83.
- [34] N. Lal and P. Sachan, "Effect of Different Visible Light Wavelengths on Seed Germination and Photosynthetic Pigment Contents in *Vigna unguiculata* (L.) Walp.," *Indian Journal of Biology*, vol. 4, no. 2, pp. 132–136, 2017.
- [35] A. Jala, "Effects of Different Light Treatments on the Germination of *Nepenthes mirabilis*," *Int Trans J Eng Manag Appl Sci Technol*, vol. 2, no. 1, pp. 83–91, 2011.
- [36] J. Wendel, "Genome evolution in polyploids," *Plant Mol Biol*, vol. 42, no. 1, pp. 225–249, 2000, doi: 10.1023/A:1006392424384.
- [37] Y. Soto, "Determinación del Nivel de Ploidía de Híbridos Interespecíficos de *Solanum* Sección Petota, Solanaceae," Licenciatura, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú, 2006.
- [38] R. Krishnaswami and R. Andal, "Stomatal chloroplast number in diploids and polyploids of *Gossypium*," *Proceedings / Indian Academy of Sciences*, vol. 87, no. 5, pp. 109–112, May 1978, doi: 10.1007/BF03046960.
- [39] C. Singsit and P. Ozias-Akins, "Rapid estimation of ploidy levels in in vitro-regenerated interspecific *Arachis* hybrids and fertile triploids," *Euphytica*, vol. 64, no. 3, pp. 183–188, Jan. 1992, doi: 10.1007/BF00046047.
- [40] A. B. Setiawan, C. H. Teo, S. Kikuchi, H. Sassa, and T. Koba, "An improved method for inducing prometaphase chromosomes in plants," *Mol Cytogenet*, vol. 11, no. 1, p. 32, Dec. 2018, doi: 10.1186/s13039-018-0380-6.
- [41] U. Claussen *et al.*, "Demystifying chromosome preparation and the implications for the concept of chromosome condensation during mitosis," *Cytogenet Genome Res*, vol. 98, no. 2–3, pp. 136–146, 2002, doi: 10.1159/000069817.
- [42] J. Rodríguez-Domínguez, "CARACTERIZACIÓN CITOGENÉTICA DE GEOFITAS MEXICANAS CON POTENCIAL ORNAMENTAL," Doctorado, CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A. C., Guadalajara, Jalisco, 2016.
- [43] D. Ami *et al.*, "Role of water in chromosome spreading and swelling induced by acetic acid treatment: a FTIR spectroscopy study," *European Journal of Histochemistry*, vol. 58, no. 1, Feb. 2014, doi: 10.4081/ejh.2014.2330.
- [44] J. Rodríguez-Domínguez, "Tradescantia orchidophylla, planta olvidada por más de un siglo," in *ORNAMENTALES NATIVAS DE LATINOAMÉRICA: notas de divulgación científica*, G. Facciuto and M. Soto, Eds., Instituto de Floricultura, INTA; Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA), 2023, pp. 13–15.
- [45] F. Scaramuzzi, G. Apollonio, and S. D'Emérico, "In vitro propagation of two species of commelinaceae from bud cultures and repeated subcultures on a growth regulator-free medium," *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 36, no. 5, pp. 379–382, Sep. 2000, doi: 10.1007/s11627-000-0068-5.
- [46] M. Rodríguez, M. Latsague, M. Chacón, and P. Astorga, "Inducción in vitro de callogénesis y organogénesis indirecta a partir de explantes de cotiledón, hipocótilo y hoja en *Ugni molinae*," *Bosque*, vol. 35, no. 1, pp. 111–118, Apr. 2014, doi: 10.4067/S0717-92002014000100011.
- [47] G. Aguilera-Arango, E. Gómez-López, and A. González-Mejía, "Callogénesis en cultivares híbridos de *Cocos nucifera* L. mediante cultivo in vitro de inflorescencias inmaduras," *Biotechnol Veg*, vol. 19, no. 4, pp. 277–284, 2019.

- [48] D. A. Steinmacher, N. G. Krohn, A. C. M. Dantas, V. M. Stefenon, C. R. Clement, and M. P. Guerra, "Somatic Embryogenesis in Peach Palm Using the Thin Cell Layer Technique: Induction, Morpho-histological Aspects and AFLP Analysis of Somaclonal Variation," *Ann Bot*, vol. 100, no. 4, pp. 699–709, Oct. 2007, doi: 10.1093/aob/mcm153.

1.8. Anexos generales

No se cuentan con anexos.

2. Productos

Ficha descriptiva: Información de la correlación de células estomas con nivel de ploidía

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Micropropagación y estudios citogenéticos de especies de bulbosas mexicanas en el CIATEJ
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Información sobre la correlación de células guardas, tamaño de estomas, así como fotografías de los estomas <i>Sprekelia formosissima</i> a diferentes ploidías. Está destinada a ser usada por el CIATEJ.
Autores:	Alexandra Arenas Lozoya

Ficha descriptiva: Efecto de longitudes de onda de luz sobre germinación de semillas

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Micropropagación y estudios citogenéticos de especies de bulbosas mexicanas en el CIATEJ
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Información sobre el efecto de las distintas longitudes de onda de luz en la germinación de semillas de <i>Tigridia pavonia</i> . Está destinada a ser usada por el CIATEJ.
Autores:	Alexandra Arenas Lozoya

3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

3.1 Sensibilización ante las realidades

Durante el desarrollo del PAP, comprendí la importancia de la biotecnología como una herramienta para abordar desafíos, tales como la micropropagación de diversos bulbos. En este contexto, me enfoqué en contribuir a la resolución de problemáticas regionales, específicamente en el ámbito de la micropropagación de bulbos, visualizando la oportunidad de reducir costos, aumentar la disponibilidad de material vegetal y estudiar la genética de las variedades de interés.

Paralelamente, experimenté frustración al enfrentar desafíos con la pérdida de material vegetal, ya sea por problemas de contaminación o por la escasez de este, lo que impulsó la realización de experimentos adicionales y la culminación de otros. Observé cómo la disponibilidad y el crecimiento del material vegetal influyen en el desarrollo de proyectos, lo que me permitió comprender la perspectiva de los productores que dependen de estos recursos para llevar a cabo su venta.

Al comprender la esencia del problema, que se centra en la preferencia por plantas ornamentales locales sobre las importadas, mi perspectiva sobre la relevancia de mi trabajo ha evolucionado. Debido a que anteriormente no le daba importancia ni lo veía como un problema, pero se volvió evidente de cómo nuestras acciones pueden impactar directamente en la preservación de la biodiversidad y en la promoción de la flora autóctona.

A pesar de los desafíos, destaco la importancia del respeto y la responsabilidad en el entorno de trabajo, subrayando la necesidad de mantener un ambiente de laboratorio limpio y seguir protocolos rigurosos para evitar interferencias en la investigación de los demás. Además, he tomado conciencia de la relevancia de la comunicación en el ámbito científico. En varias

ocasiones, me encontré confundida sobre el uso de equipo o la ejecución de la metodología, y al plantear preguntas a mis compañeros lograron resolver mis dudas. Estas interacciones no solo fueron esenciales para mi aprendizaje, sino que también se ve reflejado el valor de la comunicación en el proceso de investigación.

3.2 Aprendizajes logrados

Al comienzo del PAP, me enfrenté al desafío de aprender a utilizar la técnica de SteamDrop para lograr una dispersión cromosómica. No solo fue necesario adquirir conocimiento sobre la técnica, sino también investigar cada paso para comprender su razón y tener la capacidad de modificar el protocolo según las particularidades de la especie. Cada ajuste significaba una mejora en la visualización de los cromosomas. Sin embargo, debido a la limitación de material vegetal, no fue posible continuar modificando el protocolo para obtener el resultado final deseado.

Durante este proceso, adquirí conocimientos valiosos sobre la relación de ploidía y la cantidad de estomas, así como la influencia de la longitud de onda en la germinación de semillas. Además, descubrí los estudios citogenéticos, desde entender los conceptos fundamentales, su importancia y dominar la técnica.

Una gran lección que me llevo es la importancia de la paciencia en la realización de los experimentos. A diferencia de mi experiencia previa en los laboratorios de materias, donde la falta de resultados no tenía mayores consecuencias, aquí aprendí la necesidad de persistir y seguir intentando. Este desafío fue considerable, especialmente al observar el éxito de mis compañeros, lo que generaba momentos de frustración. No obstante, el Dr. José Manuel me recordaba que cualquier avance en estos estudios tenían un peso considerable, ya que nadie más lo había logrado; de esta manera, cualquier descubrimiento se volvía significativo.

Estas experiencias en el laboratorio me ayudaron mucho a crecer tanto profesional como personalmente. Ampliaron mis conocimientos en el área de cultivos de células y tejidos vegetales, proporcionándome una comprensión más profunda de la teoría, uso de equipos y reactivos.

El PAP concluyó con la realización de procedimientos de citogenética tradicional, micropropagación, creación de nuevos medios de cultivo, análisis de ploidía, familiarización con la técnica de cuantificación de ADN ribosomal. Estos logros han fortalecido mis habilidades y conocimientos, marcando un momento significativo en mi desarrollo académico y profesional. Aprendí sobre mis competencias ya desarrolladas y las que me faltan por desarrollar. Considero una valiosa oportunidad para reflexionar acerca de nuestras habilidades y aprovecharlas en vez de compararme con los demás. Fue algo nuevo tener que trabajar por mi cuenta, ya que estaba acostumbrada a tener un equipo de apoyo en las clases con los que contaba para realizar las prácticas de laboratorio.

3.3 Inventario de competencias Inicial (ingreso del PAP) e Inventario de competencias Final (salida al PAP).

	Competencia	Evidencia	Relevancia/ Fortaleza	Competencias nuevas	Competencias potencializadas
Categoriza las competencias en conocimientos, habilidades y actitudes. Escribe la o las evidencias de cada competencia y su relevancia.	Actualización del conocimiento.	Reconozco cuando no poseo conocimientos en algún ámbito y busco la forma de eliminar esa brecha.	Al estar informada de las actualizaciones me sería más fácil dar opiniones o modificaciones a los métodos.	Elaboré correctamente solución stock de medio SH.	Fortalecí la detección y conteo de cromosomas en microscopio.
	Manejo de tecnologías	Poseo interés por manejar las tecnologías necesarias para el desarrollo del proyecto.	Al tener el incentivo de aprender el uso de programas y herramientas específicas para el trabajo puedo lograr mayor eficiencia y eficacia en los procesos.	Desinfecte explantes con PPM, nanopartículas de plata, bactericida b.xitral y cloruro de mercurio.	Fortalecí mi habilidad de realización de medios
	Análisis estadístico e interpretación de datos.	Poder analizar los resultados y compararlos con la teoría para verificar si son congruentes.	Poder hacer discusiones de los resultados y proponer como se podría mejorar el experimento.	Elaboré laminillas con ADN extraído de las raíces para observación de cromosomas.	Fortalecí mi habilidad de tolerancia a la frustración debido a que a pesar de muchas limitaciones y complicaciones logré llevar

				adelante el proyecto.
	Control de variables como pH, temperatura y agitación en procesos.	Manipular las variables en cada caso de estudio para ver cómo afectan.	Poder manipular las variables para poder obtener mejores resultados y ver como se ve afectado el experimento.	Observé de cloroplastos en el microscopio.
Habilidades	Puedo adaptarme a los cambios del entorno.	Mantengo el mismo nivel y ritmo de trabajo pese a los cambios.	Propondría acciones ante los cambios para transformar las debilidades en fortalezas y sabría aceptar positivamente los cambios.	
	Capaz de tomar la iniciativa y anticiparme a las situaciones diarias, planificando a mediano y largo plazo.	Actúo con determinación y decisión para alcanzar metas.	Logro que los objetivos se lleven a cabo.	
	Negociación	Soy capaz de lograr acuerdos satisfactorios.	Manejar técnicas de negociación.	
	Planificación	Voy realizando un seguimiento de la planificación y corrigiendo los errores.	Priorizaría las tareas y el cumplimiento de metas desarrollándolos a la vez que el trabajo en equipo.	
	Trabajo en equipo.	Apoyo las acciones de otras áreas y equipos.	Complementaría las habilidades propias con los demás.	
	Actitudes	Asumo con responsabilidad los objetivos y compromisos.	Cumplo con mis obligaciones laborales según las que me asignen.	Logro un equilibrio entre mis intereses personales y obligaciones laborales.
Puedo conectarme con otras personas y respondo adecuadamente.		Escucho activamente al otro.	Ofrezco una relación cálida donde comprendo los sentimientos y necesidades del otro.	

	ente a las necesidades de los otros.				
--	--	--	--	--	--

Entre los talentos que poseo, destaco mi destreza en el laboratorio, que incluye desde la manipulación de microorganismos hasta la ejecución de investigaciones para el desarrollo de productos. Además, cuento con una gran comprensión científica, permitiéndome analizar y comprender procesos biológicos a nivel molecular. Mi habilidad para analizar datos, empleando herramientas bioinformáticas, así como mi pensamiento crítico, son también aspectos que apporto.

Este conjunto de habilidades lo pongo al servicio de la sociedad con un compromiso ético. Considero las implicaciones éticas y sociales de los avances científicos, tomo en cuenta los impactos medioambientales y busco compartir conocimientos con la comunidad mediante la educación y la divulgación científica. Además, durante mis investigaciones, me aseguro de citar adecuadamente a otros investigadores, respetando la integridad académica.

En el transcurso del proyecto PAP, desarrollé nuevas competencias, como la desinfección de explantes y la elaboración de medios de cultivo. También potencialicé habilidades existentes, incluyendo la detección de cromosomas, la tolerancia a la frustración y la preparación de medios de cultivo. Estas habilidades adquiridas no solo fueron cruciales para el éxito del proyecto, sino que también contribuyeron significativamente a mi desarrollo profesional, enriqueciéndome con conocimientos valiosos.

Agradecimientos:

Al Laboratorio Nacional PlanTECC por el apoyo otorgado para realizar la presente investigación.