

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 caracterización citogenética de cinco especies de
agave: *Agave guiengola*, *Agave geminiflora*, *Agave attenuata*, *Agave*
***salmiana* y *Agave victoriae-reginae* en el CIATEJ**

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología, Vanessa Nataly Magaña Avalos

Profesor PAP: Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez

Tlaquepaque, Jalisco, mayo 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	6
1.2 Caracterización de la organización.....	6
1.3 Identificación de la(s) problemática(s)	7
1.4. Planeación de alternativa(s).....	8
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	10
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	26
1.7. Bibliografía y otros recursos	34
1.8. Anexos generales	37
2. Productos	37
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	44
3.1 Sensibilización ante las realidades	44
3.2 Aprendizajes logrados	46

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

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 del Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I tuvo como principal objetivo desarrollar la micropropagación y caracterización citogenética de cinco especies de agave: *Agave guiengola*, *Agave geminiflora*, *Agave attenuata*, *Agave salmiana* y *Agave victoriae-reginae* en el CIATEJ, a través del establecimiento *in vitro* de explantes de *A. attenuata* y germinación de semillas *A. geminiflora* y realizar su multiplicación, así como de *A. guiengola*, *A. salmiana*, y *A. victoriae-reginae* por proliferación de yemas axilares. Para *A. geminiflora* se logró un porcentaje de germinación de 26.2%. En *Agave attenuata* ocurrió contaminación en el 100% de los explantes, en medio con nanopartículas de plata y PPM como biocida preservante, por lo que no se logró su establecimiento *in vitro*. Se realizó un diseño factorial de 16 tratamientos para *A. salmiana*, probando distintas combinaciones de ácido 2,4-D y 6-bencilaminopurina (BA) como reguladores de crecimiento, donde se determinó que una concentración de 25 µg/L de 2,4-D y sin BA generó la mayor cantidad de brotes. De igual modo, se determinó el número cromosómico de las cinco especies a través de muestras de raíz y de realizar la hibridación *in situ* con genes de ADN ribosomal para obtener el cariotipo e idiograma correspondiente a cada especie. Se encontró que las especies *A. guiengola*, *A. geminiflora*, *A. attenuata* y *A. victoriae-reginae* son diploides, con un total de $2n = 2x = 60$ cromosomas y *A. salmiana* con $2n = 5x = 150$ cromosomas, una especie pentaploide.

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 construir 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 CIATEJ, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., es un centro público de investigación perteneciente al Conacyt, Consejo

Nacional de Ciencia y Tecnología, dedicado a impulsar el desarrollo sostenible de la sociedad mexicana, a través de la asistencia a empresas tecnológicas, generación de conocimientos y formación de recursos humanos especializados, entorno a la biotecnología. Actualmente la institución se desarrolla en cinco líneas de investigación, distribuidas a través de cuatro centros en la república mexicana. Dichas líneas son la biotecnología vegetal, ambiental, alimentaria, industrial y médica farmacéutica [1].

El presente proyecto es realizado dentro de la unidad de biotecnología vegetal, enfocada al sector agrícola. Dentro de sus principales funciones se encuentran el desarrollo de técnicas de micropropagación de especies, mejoramiento genético para aumentar su productividad, resistencia a plagas y condiciones medioambientales desfavorables, fitopatología (estudio de las enfermedades que afectan las plantas), y desarrollo de productos a base de metabolitos vegetales con fines nutricionales y alimenticios, entre otras industrias [2].

Durante este periodo, se realizará un proyecto experimental que pretende caracterizar citogenéticamente cinco especies de agave: *Agave guiengola*, *Agave geminiflora*, *Agave attenuata*, *Agave salmiana* y *Agave victoriae-reginae*. Estos estudios comprenderán particularmente, el número cromosómico y la ploidía (juegos cromosómicos), datos que, para las primeras tres especies, dentro de la región de Jalisco, no se encuentran reportados en las fuentes consultadas. Además, se llevará a cabo la micropropagación de estas especies, para responder a las necesidades del mercado comercial de agaves ornamentales, entorno al tiempo y productividad, para la evaluación de un protocolo de propagación mediante yemas axilares.

Objetivo general

Micropropagar y caracterizar citogenéticamente las especies *Agave guiengola*, *Agave geminiflora*, *Agave attenuata*, *Agave salmiana* y *Agave victoriae-reginae*.

Objetivos específicos

- Establecer *in vitro* explantes de *A. geminiflora* y *A. attenuata*.

- Realizar la multiplicación *in vitro* por proliferación de yemas axilares de *A. guiengola*, *A. geminiflora*, *A. attenuata*, *Agave salmiana* y *A. victoriae-reginae*.
- Llevar a cabo el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de las cinco especies.
- Adaptar *ex vitro* las plántulas enraizadas.
- Determinar el número cromosómico de las cinco especies a través de muestras de raíz.
- Realizar la hibridación *in situ* con genes de ADN ribosomal.
- Obtener el cariotipo e idiograma correspondiente a cada especie.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

En la unidad de biotecnología vegetal del CIATEJ se encuentra la línea de investigación de mejoramiento genético vegetal, y una de las metodologías empleadas para ello es la poliploidización de las especies, que consiste en la generación de copias completas de los juegos cromosómicos. Este procedimiento ocurre de manera natural en el reino vegetal y se induce de forma experimental con la intención de aumentar la proporción de genes alélicos y que se dé la aparición de características de interés particular en la planta [3]. Para poder establecer un objetivo específico de poliploidía inducida y evaluar los resultados de los procedimientos que se lleven a cabo, es esencial conocer la ploidía de la especie, la cantidad de juegos cromosómicos completos que posee el fenotipo estudiado; en esto radica la importancia de conocer el número cromosómico de las especies a mejorar. En el CIATEJ se han realizado estudios citogenéticos de esta índole en otras especies de agaves, como es el caso de *A. applanata* y *A. salmiana*, originario del estado de Hidalgo [4].

1.2 Caracterización de la organización

Como se estableció anteriormente, el CIATEJ tiene la misión de impulsar el desarrollo sostenible en la sociedad a través de la generación de conocimiento con aplicaciones científicas y tecnológicamente innovadoras. Así mismo, tiene como visión generar redes de colaboración con instituciones nacionales e internacionales, y fomentar el trabajo en

colaboración con el sector público y privado para lograr su objetivo. Este centro cuenta con dos sedes en el Estado de Jalisco, en el municipio de Guadalajara y en Zapopan. El presente Proyecto de Aplicación Profesional (PAP) se desarrolla en la sede Zapopan, ubicada en Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jal. En esta unidad se encuentran las especialidades de biotecnología vegetal, alimenticia e industrial [2].

El departamento de biotecnología vegetal, dirigido por la Dra. Antonia Gutiérrez Mora, que acoge este proyecto, a su vez cuenta con ramas de especialización. Dentro de las áreas de Micropropagación de especies vegetales y Mejoramiento genético vegetal es que se encuentra el investigador Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez, con el que se trabaja este PAP. El Dr. Rodríguez, perteneciente a las líneas de investigación de Cultivo de células y tejidos vegetales, Citogenética tradicional y molecular, y poliploidización, se encarga de micropropagación y mejoramiento genético de especies ornamentales y agaves [5].

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

Entre los diversos usos que el pueblo mexicano le ha dado a las variedades de agaves, uno de los principales es como ornato, entre las que se encuentran las especies a valorar en el presente proyecto. Este género, *Agave*, se puede reproducir de forma sexual o asexual. En cualquiera de los casos, son periodos prolongados los que se debe esperar para poder tener el material biológico para llevar a cabo la reproducción, ya que se debe permitir a la planta madre alcanzar la madurez [6] que, dependiendo de la variedad, puede tomar desde 4 hasta 25 años [7]. La vía asexual depende de la recolección de hijuelos, mientras que la vía sexual es a través de semillas. Así mismo, ambos métodos requieren conocer las temporadas de recolección o cosecha, evaluación del estado de madurez, salud, y las correctas técnicas de extracción [6].

Estos tiempos de espera y conocimientos particulares acomplejan el crecimiento económico para los productores, quienes han acudido la institución, CIATEJ, buscando la propagación de algunas especies de agaves. Sin embargo, el centro de investigación además de no contar con un ala comercial como biofábrica, requiere primeramente desarrollar un adecuado

protocolo de micropropagación para cada una. Este proceso adquiere especial relevancia, ya que algunas de las especies a valorar, como el agave *A. victoriae-reginae*, se encuentran catalogadas como ‘amenazadas’, y el cambio climático desfavorable, así como la extracción desmesurada de ejemplares en la naturaleza, ponen en riesgo su subsistencia de forma silvestre. De acuerdo con el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, los principales factores que afectan su desarrollo son sequías por periodos prolongados, bajas temperaturas en invierno y la sombra excesiva, esencialmente en etapas tempranas del crecimiento [6].

Aunado a ello, también, se mencionó durante la junta con el investigador encargado, Dr. José Manuel Rodríguez, que una de las problemáticas actuales entorno los plantíos de agaves, es la aparición de plagas que afectan a sembradíos completos y se esparcen con facilidad, ya que dichas plantas suelen ser clones, al provenir de hijuelos en su mayoría y no generan resistencia a enfermedades. Es por ello que los productores de dichas variedades podrían beneficiarse de la inserción de alguna modificación genética que les provea a sus plantas resistencia a plagas y a los factores ambientales antes mencionados.

Previo a llevar a cabo ese proceso, es de vital importancia conocer algunos aspectos citogenéticos de las muestras a trabajar, tales como el número cromosómico de la especie, su ploidía y la identificación y ubicación de genes de interés en el/los cromosomas correspondientes. No obstante, no se ha hallado registro de estos datos para las especies regionales de *A. guiengola*, *A. geminiflora*, *A. attenuata*, *A. salmiana* y el fenotipo de *A. victoriae-reginae* del centro de investigación.

1.4. Planeación de alternativa(s)

Para generar un gran número de plántulas sanas en un tiempo reducido, existen diferentes métodos de micropropagación. Dichos métodos se basan en la totipotencia de las células vegetales, que es su capacidad para dar origen a todos los tipos de células diferenciadas de un organismo [8]. El método más utilizado y el que se desarrolla en el presente proyecto es

el de proliferación de yemas axilares, ya que este permite limitar la variación genética de los ejemplares generados [9].

A continuación, la tabla 1 presenta el cronograma de actividades a desarrollar para el cumplimiento de los objetivos del proyecto a lo largo de 16 semanas, y en la tabla 2 se detallan los recursos materiales, técnicos y humanos requeridos en cada actividad.

Tabla 1. Cronograma de actividades

Objetivo	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	Semana 17
Micropropagación	Preparación de medio basal MS concentrado	AV AP	1																	
	Preparación medio de cultivo para <i>A. salmiana</i>	AV	4																	
	Preparación de otros medios de cultivo	AV	1																	
	Trasplante a macetas y poda		1																	
	Riego de plantas		2																	
	Búsqueda/recolección de hijuelos/explantes	MD	1																	
	Establecimiento <i>in vitro</i> (semilla/explante)	SD ME CF AP	1																	
	Revisión de cultivos <i>in vitro</i>		1																	
	Cambio de medio a plantas <i>in vitro</i>	ME CF	1																	
Citogenética	Revisión/Recolección de raíces nuevas	MD	1																	
	Extracción de pellet de raíces	MD CT AP	3																	
	Preparación y tinción de laminillas con células	BM CE AP	1																	
	Observación de laminillas en microscopio	MI	1																	
	Conteo cromosómico en 40X	MI SI	1																	
	Recuperación de imágenes de cromosomas en 100X	MI AP SI	1																	
	Medición de cromosomas	AP SK	1																	
Trabajo documental	Investigación personal		1																	
	Revisión del RPAP por asesor del proyecto		1																	
	Revisión del RPAP por el director Dr. Rodríguez	AP																		
	Presentación oral del PAP		1																	

Tabla 2. Abreviaturas de los recursos en el cronograma de actividades

Abreviatura	Significado
ME	Material estéril (pinzas, bisturí y vidrio de corte)
AP	Asesoría de profesor Dr. Manuel Rodríguez (director del PAP)
CE	Campana de extracción
CF	Campana de flujo laminar
MI	Microscopio
CT	Centrífuga de tubos de 1 mL
BM	Baño María

AV	Autoclave
SD	Soluciones desinfectantes esteriles (etanol, cloro y agua)
MD	Material Desinfectado (pinzas, bisturí y vidrio de corte)
SK	Software KaryoMeasure
SI	Software Image-Pro AMS

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Preparación del medio basal MS

Para la elaboración de todos los medios de cultivo se prepararon 5 litros inicialmente de una solución stock del medio propuesto por Murashigue y Skoog (MS), concentración 10X, que fueron utilizados posteriormente para la elaboración de otros medios específicos. A continuación, en las tablas 3 a 7 se especifican los componentes y la concentración requerida para la preparación de cada solución stock (considerando que serían posteriormente diluidos al aforar a 5 L). Para la preparación de cada solución es necesario que los reactivos sean incorporados en el orden en que se encuentran dispuestos y agregar el siguiente componente hasta que el anterior este completamente disuelto [10]. Para esto se empleó una placa de agitación magnética.

En la tabla 3 se presentan los macronutrientes, requeridos en mayor cantidad, por lo que se empleó una balanza granataria para su medición. Por la concentración de las sales, así como por ser un proceso endotérmico el que se lleva a cabo durante su dilución, fue necesario calentar la placa de agitación para promover la disolución, esta fue configurada a 100°C durante el proceso. De macronutrientes se elaboraron 500 mL de solución.

Tabla 3. Solución stock de macronutrientes para medio MS.

Nombre del compuesto	Concentración (g/L)
Nitrato de amonio	165
Nitrato de potasio	190
Sulfato de magnesio heptahidratado	37
Fosfato de potasio Monobásico	17

En la tabla 4 se indican las concentraciones de los micronutrientes, pesados en una balanza analítica para tener mayor precisión en los miligramos pesados, a diferencia de los macronutrientes, cuya concentración está dada en gramos. Para facilitar el pesaje y mantener la precisión de la concentración, se generaron 500 mL de solución de micronutrientes, sin embargo, a la mezcla total de medio MS únicamente se agregaron 250 mL, el resto fue guardado en un recipiente plástico en congelador a -20°C.

Tabla 4. Solución stock de micronutrientes para medio MS.

Nombre del compuesto	Concentración (mg/L)
Ácido bórico	1.24
Sulfato de manganeso tetrahidratado	3.38
Sulfato de zinc heptahidratado	1.72
Yoduro de potasio	166
Molibdato de sodio dihidratado	50
Sulfato de cobre pentahidratado	5
Cloruro de cobalto hexahidratado	5

Las tablas 5, 6 y 7 muestran la concentración para la preparación de las soluciones stock de compuestos orgánicos (también encontrados en referencias como vitaminas), hierro-EDTA (para ambos se elaboró medio litro de su correspondiente solución stock) y cloruro de calcio dihidratado (se prepararon 1100 mL) respectivamente.

Tabla 5. Solución stock con compuestos orgánicos para medio MS.

Nombre del compuesto	Concentración (mg/L)
Tiamina HCl	10
Piridoxina HCl	50
Myo-Inositol	10,000
Ácido nicotínico	50
Glicina	200

Tabla 6. Solución stock de hierro-EDTA para medio MS

Nombre del compuesto	Concentración (g/L)
Sulfato ferroso heptahidratado	2.78
Etilendinitrilotetraacetado de sodio	3.73

Tabla 7. Solución stock de cloruro de calcio para medio MS.

Nombre del compuesto	Concentración (g/L)
Cloruro de calcio dihidratado	20

Por último, se mezclaron las 5 soluciones y se aforaron a 5L empleando agua destilada, con probeta de 1000mL. Finalmente se repartió en botes de plástico de 100mL, que serían empleados de forma directa en otros procedimientos, para ello se utilizó probeta de esta misma medida para asegurar dicho volumen. Se taparon y guardaron a -20°C.

Establecimiento ex vitro y recolección de raíz

Para la obtención de explantes de *Agave attenuata* se recolectaron hijuelos de la planta madre, del jardín de agaváceas del CIATEJ (figura 1). Los dos agaves más grandes fueron dispuestos para plantar en macetas y los de menor tamaño se emplearon para establecimiento *in vitro* como se detallará más adelante en otra sección. Para las especies de *A. guiengola*, *geminiflora*, y *victoriae-reginae* se obtuvieron 2 plántulas de cada una del invernadero de aclimatación, que fueron plantados igualmente en macetas de aproximadamente 2.5 L de volumen.

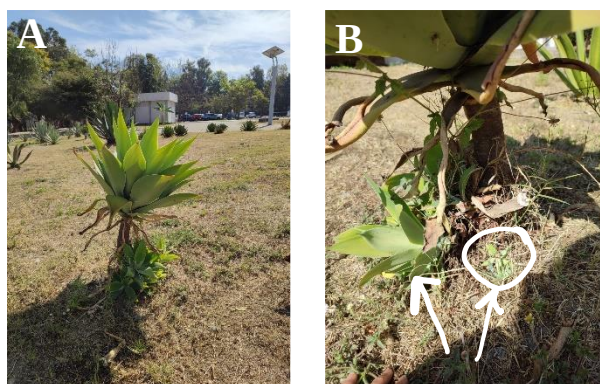


Figura 1. A) *Agave attenuata* en CIATEJ e B) hijuelos señalados

Con apoyo de tijeras cortas de jardinería se cortaron todas las raíces de los agaves y se procuró retirar toda la parte oxidada de la base, observable por su característica coloración marón, así como las hojas más próximas a la base. Se colocaron aproximadamente 2 gramos de polvo enraizador Radix 1500® sobre una charola y se introdujeron los hijuelos a este uno por uno, seguido del trasplante a las macetas con tierra (figura 2). Se comenzó regándolas cada tercer o cuarto día, según la apariencia de la tierra en la superficie.



Figura 2. A) Contenido de polvo enraizador en la base de agaves, sin raíces. B) *Agave geminiflora* con evidencias de estrés hídrico. C) Establecimiento *ex vitro* de 4 especies de agave, en orden de izquierda a derecha: *A. victoriae-reginae*, *A. quiengola*, *A. geminiflora*, *A. attenuata*.

Inicialmente se utilizó tierra arenosa, sin embargo, se observó al paso de los días que esta se comprimía tras el riego, aunado a esto, no permitía el correcto drenaje y por ende acumulaba mucha agua. Se presentó pudrición de las hojas más externas y presencia de hongo en algunas de ellas. Al cabo de dos semanas, las plántulas fueron trasplantadas nuevamente, se realizó un cambio de sustrato, empleando el Mix BM2 de la marca Berger, para germinación, hecho a partir de fibra natural de madera de grado fino y peat moss, musgo canadiense *sphagnum*. De acuerdo con lo reportado en el sitio web del productor, este sustrato estimula el enraizamiento [11]. Se continuó con la misma programación de riego.

El problema de humedad y contaminación se resolvió con el cambio de sustrato. A la semana siguiente se realizó la primera recolección de raíz de *A. victoriae*, sin embargo, al ser mínima la muestra recolectada y no presentar crecimiento de raíz en las otras especies, se espaciaron los riegos de 1 a 2 veces por semana, para estimular el desarrollo de raíz por estrés hídrico

[14], y al cabo de dos semanas se logró realizar extracción de raíz de todas las especies con una adecuada cantidad de muestra.

Previo a la revisión de raíces, se prepararon 8 tubos Eppendorf de 1mL con α -bromonaftaleno (1-bromonaftaleno) al 0.1%, como arrestador mitótico, agregando 1 μ L de bromo-naftaleno en 999 μ L de agua grado Mili-Q, con micropipetas de 2.5 μ L y 1000 μ L respectivamente. Dentro de los tubos se colocaron las muestras de raíz al momento de realizar el corte, cuidando de no mezclar especies. De acuerdo al volumen de raíz recuperada se pueden usar 1 o más tubos [15].

La revisión de los agaves se llevó a cabo por las mañanas en un horario entre 8 y 10 am, procurando no rebasar las 11 am, para encontrar aun las raíces en fase de división celular. Al realizar este procedimiento, los agaves, se enjuagaron de la base con agua y con ayuda de una pinza delgada y bisturí con hoja no. 11, se cortaron las raíces. Para raíces más largas se procuró solo la punta con el tejido más blanco, donde se encuentran los meristemos, del mismo modo, se retiró toda la raíz desde la base de la planta para estimular su nuevo crecimiento para próximas recolecciones (figura 3). Debido a que se trabajó con especies distintas, entre cada una se realizó limpieza del bisturí y pinzas, empleando etanol al 70% y una sanita [15].

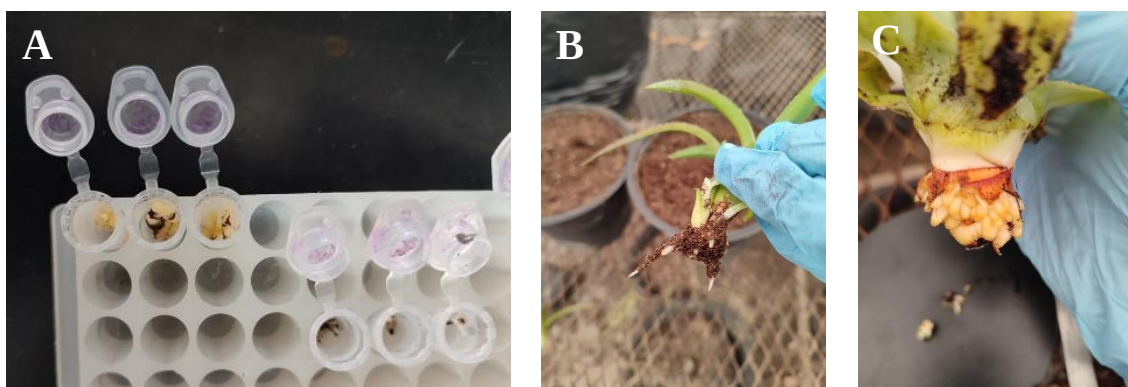


Figura 3. A) Recolección y tratamiento de raíces en α -bromonaftaleno. B) Raíces de *A. victoriae-reginae*. C) Raíces *A. attenuata*, de aspecto más grueso y coloración amarilla.

Tratamiento de raíz y extracción de pellet celular

Las muestras se dejaron en α -bromonaftaleno por 24 horas, a 4°C. Al día siguiente se retiró el arrestador con ayuda de una micropipeta de 1000 μ L y se depositó en un envase etiquetado para su disposición. Se añadió 1mL de una mezcla 3:1 de metanol: ácido acético, a 4°C a cada tubo y se dejaron en refrigeración nuevamente por 24 h. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución y se enjuagaron las raíces con agua Mili-Q por 10 minutos y se retiró de igual modo con micropipeta [15].

Seguido de ello, con un bisturí y pinzas desinfectadas se extrajeron y cortaron los meristemos, dejando únicamente la parte más blanca (o amarillo en algunas especies como *A. attenuata*) de la raíz recolectada, con el fin de tratar únicamente células que se encontraban en mitosis, como se muestra en la figura 4. Se tomaron las mismas precauciones que al momento de su recolección para evitar contaminación cruzada de células. Los meristemos diseccionados se regresaron al tubo, se añadió 1mL de buffer de citrato 10 mM, pH 4.5 (elaborado previamente con 10mM de citrato de sodio y 10m de ácido cítrico, ajustado al pH con los mismos reactivos), por 10 min., para acondicionar las células al paso posterior [15].



Figura 4. Cortes de meristemos de *A. attenuata*.

Pasados los 10 minutos, se retiró el buffer de citrato y se añadieron 50 μ L (o según se requiriera para cubrir la raíz) de mezcla enzimática: pectoliasa Y23 al 0.2% peso/volumen, celulasa RS 0.2% p/v, y 0.2% p/v citohelicasa en buffer de citrato 10mM, pH 4.5. Se dejaron incubando las células a 37°C por 3 horas, dentro de una cámara de humedad (recipiente con

tapa, y una sanita humedecida al fondo, introducida en el incubador con anterioridad para atemperarla) [15].

Preparación de laminillas de frotis

Se mezcló en vortex la mezcla de meristemos y enzima y se retiraron las partículas grandes con pinzas. Se añadieron 600 μ L de agua mili pore (Mili-Q), se mezcló nuevamente y se centrifugaron las muestras a 6150 G por 45 segundos. El equipo empleado para este propósito fue la centrífuga Eppendorf 5415 D. Se procedió a retirar el sobrenadante con una micropipeta, se resuspendió el pellet con 600 μ L de metanol y se centrifugó a 7440 G por 30s. Se desechó el sobrenadante por inversión en un recipiente adecuado para metanol y se resuspendió el botón celular con 70 μ L de metanol (ajustable de 20-100 μ L según el volumen del botón celular). Se almacenaron los tubos con botón celular a 4°C, hasta emplearse para elaborar las laminillas [15]. Un ejemplo de un pellet resuspendido, obtenido tras centrifugación, se muestra en la figura 5C.

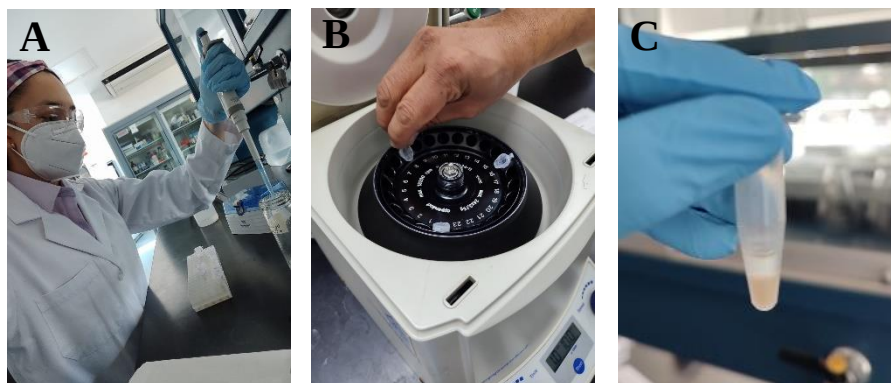


Figura 5. A) Retiro de agua mili pore de cada tubo, con micropipeta de 1000 mL. B) Centrifugación de pellet. C) Aspecto de suspensión celular tras resuspender pellet.

El siguiente procedimiento de la fase de preparación de laminillas, se realizó dentro de una campana de extracción. Se limpiaron 8 portaobjetos de cristal con etanol 70% y pañuelos de papel suave de celulosa pura. Se introdujeron los portaobjetos en una copa Coplin con ácido

acético y uno a uno se retiraron para colocarles 7 μ L de suspensión celular, previamente resuspendida con micropipeta, con el cristal en un ángulo de inclinación de aproximadamente 45°. Inmediatamente se agregaron 70 μ L de ácido acético, en esa misma posición, y se invirtió el portaobjetos sobre el vapor de un baño María a 55°C (junto a la campana, para realizarlo al momento), de modo que la muestra quedase boca abajo, durante 5 segundos. Esto se realizó para lograr una adecuada dispersión de las células en el cristal, que facilite su observación en el microscopio. Se retiraron los portaobjetos y se colocaron en posición inclinada para dejarlos secar. Se repitió el procedimiento para todas las laminillas, cambiando de punta de la micropipeta para cada botón celular, cuando se cambiara de especie [15].

Cuando se requirió observar la muestra celular para conteo cromosómico, se tiñó el frotis con acetorceína. Se limpiaron los cubreobjetos necesarios para las laminillas a evaluar, usando etanol 70% y pañuelos. Con una pipeta Pasteur se colocaron 2 gotas del colorante sobre cada portaobjetos ya preparado y seco. Se colocó encima el cubreobjetos y se presionó ligeramente colocando una sanita por arriba y por debajo de la laminilla. Se repitió para todas las laminillas. El procedimiento de tinción se representa en la figura 6.

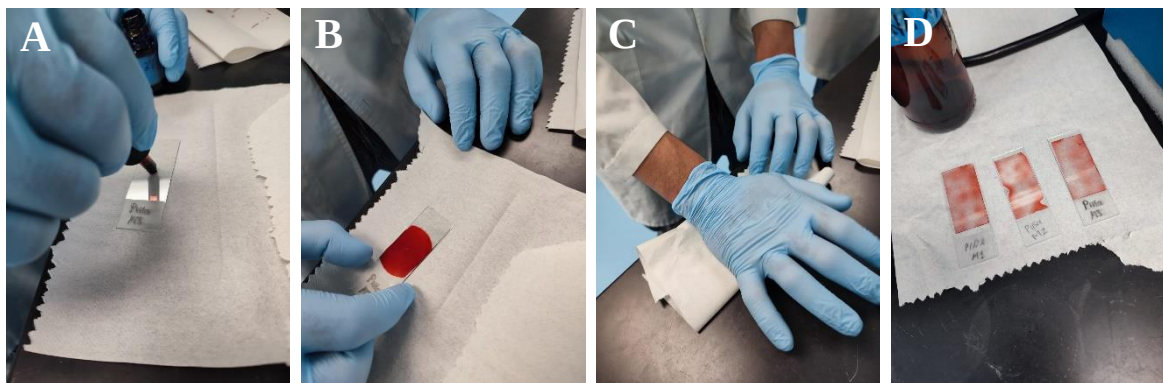


Figura 6. Proceso de tinción de laminillas con acetorceína. A) Colocación de 1 a 2 gotas de colorante sobre el portaobjetos. B) Colocación de cubreobjetos. C) Realización de presión sobre las laminillas para fijar la tinción. D) Resultado listo para observación bajo microscopio.

Conteo cromosómico

Se colocó el cubreobjetos en el microscopio de fluorescencia Leica DMRA2, en el filtro H, cubo 5. Se observó con el objetivo 5X y 10X para encontrar cromosomas condensados,

definidos y suficientemente dispersos para contarlos. Con los objetivos 20X y 40X se observó a mayor detalle y con este último se capturaron fotografías de los conjuntos adecuados usando el software del microscopio instalado en el ordenador. Se lograron definir en todas las especies 10 cromosomas grandes, que según lo indicado por el investigador Dr. José Manuel Rodríguez, es una característica en común que han observado en CIATEJ para las especies de agaváceas. En la figura 7 se muestra un ejemplo de observación de los cromosomas con el objetivo 40X para *A. quiengola*

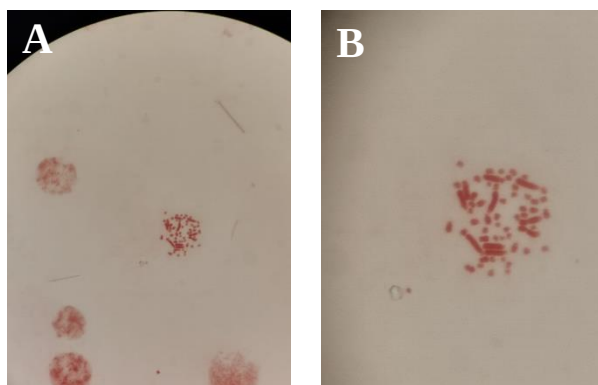


Figura 7. Observación de cromosomas de *A. quiengola* con los objetivos A) 20X y B) 40X

Citogenética

Desde la aplicación de escritorio para microscopio, Image-Pro AMS, se realizó el marcaje de cada metafase encontrada en las laminillas (figura 8A), donde se pudieran distinguir y contar adecuadamente los cromosomas de cada especie. Estos conjuntos de cromosomas fueron fotografiados con el objetivo de 40X, con aumento adicional de 1.6X, y desde la misma aplicación se les aplicó un filtro de Gauss 9x9 para mejorar su resolución, así como una barra de escala de 10 μm .

Con 10 repeticiones de estas imágenes es que se obtuvo la cuenta cromosómica reportada en la sección de resultados. Para la determinación de su tamaño y elaboración del idiograma de cada agave, se seleccionó la metafase donde se observaran más claramente y de manera separada los cromosomas, se localizaron con ayuda del programa Image-Pro AMS y los marcajes previamente realizados. Una vez ubicados con el objetivo de 40X, se procedió a

colocar una gota de aceite de inmersión sobre el campo de visión del cubreobjetos y se observaron con los objetivos de 63X y 100X (continuó aplicado el aumento 1.6X); en este último se tomó una fotografía, a la que de igual modo se aplicó un filtro gaussiano. La imagen de la metafase en 100X, se introdujo a la aplicación de Karyomeasure de la Universidad de Kurdistan para realizar la medición de cada uno (figura 8B) y generar el idiograma correspondiente.

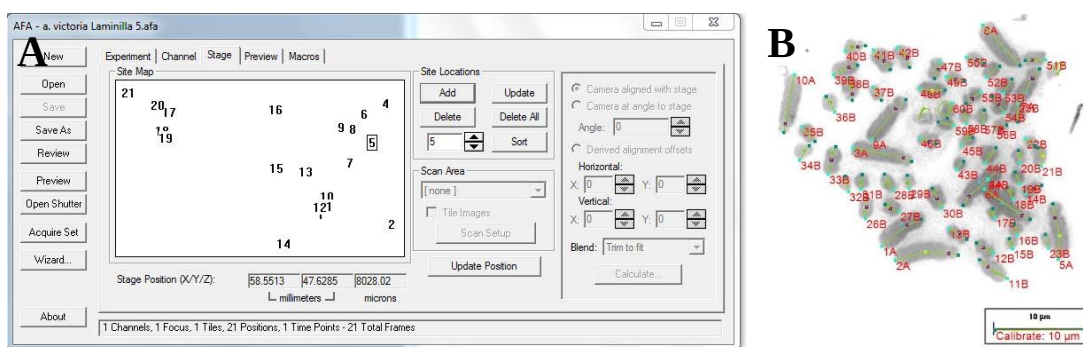


Figura 8. Manejo de software. A) Marcaje de metafases en una laminilla en Image-Pro AMS B) Medición de *A. geminiflora* en KaryoMeasure

Micropropagación de agaves

Debido a inconvenientes entorno al material vegetal disponible y empleado a la par por otros estudiantes e investigadores de la unidad, no se disponía de agaves *victoriae* y *guiengola* suficientes para llevar a cabo su micropropagación. Por lo tanto, solo se realizó la micropropagación de las especies *A. geminiflora*, *A. attenuata* y *A. salmiana*.

Micropropagación de A. geminiflora - germinación

La especie *geminiflora* fue micropropagada *in vitro* a partir de su semilla, para llevar a cabo primeramente su germinación en ambiente de esterilidad. Para ello, se preparó medio de cultivo para germinación, cuyas especificaciones se encuentran en la tabla 8. El medio MS se disolvió en 300mL de agua destilada, junto con la sacarosa. Se aforó a 500mL con una probeta de dicha medida, se trasvasó a un vaso de precipitado de 500mL y, utilizando una placa de agitación y un agitador magnético, se ajustó el pH con un potenciómetro a $5.8 \pm$

0.02 (en todos los procedimientos para preparación de medio se ajustó a pH 5.8 ± 0.02 , empleando soluciones de NaOH y HCl 1N).

Por último, se agregó el agar a un matraz de 1000mL, seguido del medio ajustado y se agitó. Para incorporar bien el agar, se introdujo el matraz a un microondas por 30 segundos, seguido de una agitación manual cuidadosa con un guante adecuado, y se repitió el calentamiento y agitación cuantas veces fueron requeridas, hasta apreciar que la espuma formada fuese clara y el medio no tuviese apariencia turbia.

Tabla 8. Composición del medio de cultivo de germinación para *A. geminiflora* [10].

Componente	Concentración
Medio MS	0.1X
Sacarosa	3 g/L
Agar	8 g/L

Una vez disuelto el agar, se repartió el medio en 7 botes de plástico de medio litro (71 mL aproximadamente en cada uno), aptos para esterilización con calor. Se cerraron con su respectiva tapa y se esterilizó en autoclave semiautomática (Sterilmatic de Market Forge Industries Inc.), por calor húmedo (a 121°C por 15 minutos, en la configuración de ‘slow’ del equipo; esto en todas las ocasiones en que se preparó medio de cultivo). Junto con el medio se esterilizaron también tres soluciones, cada una de 200 mL en el mismo tipo de botes plásticos: hipoclorito de sodio al 3%, etanol 70% y agua destilada (3 botes). Una vez terminado el proceso de esterilización (ya que hubo descendido la presión y temperatura de la autoclave), se retiraron los botes con el guante y se sellaron con cinta clean-pack (film plástico para envoltura de alimentos).

Se realizó la desinfección de aproximadamente 100 semillas, recolectadas de la flor seca de *A. geminiflora*, en campana de flujo laminar, empleando los recipientes con el contenido de las tres soluciones anteriormente mencionadas. Se sumergieron las semillas, con ayuda de un infusor metálico de pinza (figura 9), primero en el etanol por 1 minuto, manteniendo la agitación. Luego se pasaron al cloro 3% por 10 minutos, agitando ocasionalmente. Por último se realizaron tres enjuagues de 5 minutos cada uno en agua destilada. Por cada enjuague se

utilizó un recipiente distinto de los 3 de agua esterilizados. Finalmente se vaciaron las semillas a un tubo falcon de 50 mL con ayuda de unas pinzas.



Figura 9. Desinfección de semillas de *A. geminiflora*

Para el sembrado, se colocaron 12 semillas de forma esparcida, sobre el medio gelificado de cada uno de los 6 botes empleando pinzas estériles, y llevando a cabo el proceso dentro de la misma campana. Finalmente se sellaron nuevamente con clean-pack y se llevaron al incubador, programado para 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a 25 °C (estas condiciones son las mismas para todos los protocolos de micropropagación expuestos en el presente documento). Se revisaron en semanas posteriores y los resultados de la germinación se muestran en la sección de resultados en la tabla 13.

Micropropagación de A. attenuata - yemas axilares

La especie *A. attenuata* se micropropagó por el método de yemas axilares, empleando 4 hijuelos de la planta madre del jardín de agaves del CIATEJ. El medio de cultivo fue preparado de acuerdo con las especificaciones de la tabla 9, siguiendo el mismo procedimiento expresado anteriormente para el medio de germinación: primero se disolvió en agua la sacarosa con el medio MS, los reguladores de crecimiento, 2, 4-D y BA se agregaron en este paso. Luego se aforó y ajustó pH, seguido de la incorporación del agar, con calor. Se preparó medio litro, que fue repartido en partes iguales en 6 botes plásticos de 500 mL. Nuevamente, se esterilizó en conjunto las soluciones de etanol 70%, cloro 3% y 3

recipientes de agua destilada, así como un juego de bisturí, pinzas y lámina de corte. Todos los botes fueron tapados, esterilizados y posteriormente sellados hasta su uso.

Tabla 9. Composición de medio de cultivo para yemas axilares de *A. attenuata*.

Componente	Concentración
Medio MS	1X
Sacarosa	30 g/L
BA	10 mg/L
2, 4-D	25 µg/L
Agar	8 g/L

Para la desinfección de los cuatro explantes, se retiró primero todas las hojas exteriores, hasta dejar aproximadamente las tres más próximas al centro. Seguido de ello, se lavaron los explantes en solución jabonosa, al 3% v/v de jabón líquido. Se enjuagaron y se dejaron secando sobre una sanita. Dentro de la campana de flujo laminar se realizó la segunda parte de la desinfección, siguiendo el procedimiento de las semillas, en cuanto al orden y tiempo en cada solución. Los explantes se manejaron con pinzas y con estas mismas se procuró la agitación (figura 10).

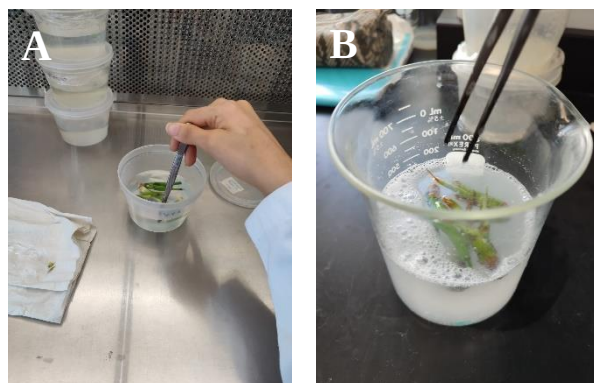


Figura 10. A) Lavado de explantes en solución jabonosa. B) Desinfección en campana con hipoclorito de sodio y etanol.

De ser necesario, se usó bisturí y una lámina de corte estériles para retirar las partes oxidadas, raíces o extremo superior muy largo, para dejar el explante de aproximadamente 4 cm. Al término del proceso, dentro de la campana, se realizó la siembra, tomando con las pinzas el explante por la parte superior y enterrando ligeramente la base sobre el medio gelificado. Se sellaron con cinta clean-pack y se llevaron al incubador.

Dado que en las semanas posteriores se encontró contaminación en 3 de los cultivos, se optó por realizar un cambio de medio, adicionando nano partículas de plata como agente de inhibición microbiana. Se siguieron los mismos pasos anteriores para la preparación del medio y se repitió la desinfección, con jabón, alcohol, cloro y enjuagues. El único cambio realizado al medio fue que previo al aforado se adicionaron 5mL de una solución de nanopartículas de plata (dispersión coloidal ámbar de nanopartículas de plata AgNp, 20 nm, concentración 0.34% de ID-nano), mostrado en la figura 11 y 500µL de preservativo para plantas Plant Preservative Mixture (PPM), que actúa como fungicida y bactericida (este debe ser adicionado dentro de una campana de flujo laminar para evitar la entrada de contaminación al envase original). La composición de este medio se presenta en la tabla 10.

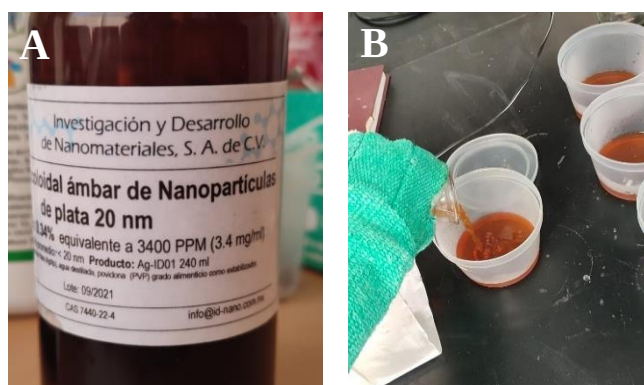


Figura 11. A) Solución de nanopartículas de plata. B) Preparación de medio con AgNp y PPM

Tabla 10. Composición de medio de cultivo para yemas axilares de *A. attenuata*, con AgNp y PPM.

Componente	Concentración
Medio MS	1X
Sacarosa	30 g/L
BA	10 mg/L
2, 4-D	25 µg/L
AgNp	10 mL/L
PPM	1 mL/L
Agar	8 g/L

Micropropagación de *A. salmiana* - yemas axilares y diseño factorial

Tras consultar en la bibliografía reguladores de crecimiento empleados para la micropropagación de agaves por el método de yemas axilares y las concentraciones empleadas, se optó por utilizar un modelo factorial 4², donde se probó la mezcla de dos reguladores distintos, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como auxina y 6-benzilaminopurina (BA) como citocinina, cada uno en 4 concentraciones distintas para evaluar la combinación óptima en el desarrollo de nuevos brotes. Por lo tanto, se prepararon 16 medios de cultivo distintos, que tenían como base lo señalado en la tabla 11 y, como añadido, los reguladores de crecimiento indicados en la tabla 12. Se utilizó un código de color para identificar fácilmente los frascos y la composición del medio figura 12. Se siguió la metodología anteriormente descrita para preparación de medio, ajustando el pH posterior a la adición y aforo de todos los componentes, a excepción del agar. Se contempló inicialmente sembrar 5 frascos por medio de cultivo, cada uno con aproximadamente 25 mL, por lo que se prepararon 125 mL de cada medio. Se emplearon frascos de cristal de 100 mL, cubiertos con tapas de plástico durante la esterilización en autoclave.

Tabla 11. Composición de medio de cultivo base, sin reguladores, para yemas axilares de *A. salmiana*.

Componente	Concentración
Medio MS	1X
Sacarosa	30 g/L
Agar	8 g/L

Tabla 12. Diseño factorial de tratamientos de reguladores de crecimiento para *A. salmiana*.

		Citocininas			
		0 mg/L	1 mg/L	5 mg/L	10 mg/L
Auxinas	0 µg/L	1A	1B	1C	1D
	20 µg/L	2A	2B	2C	2D
	25 µg/L	3A	3B	3C	3D
	30 µg/L	4A	4B	4C	4D

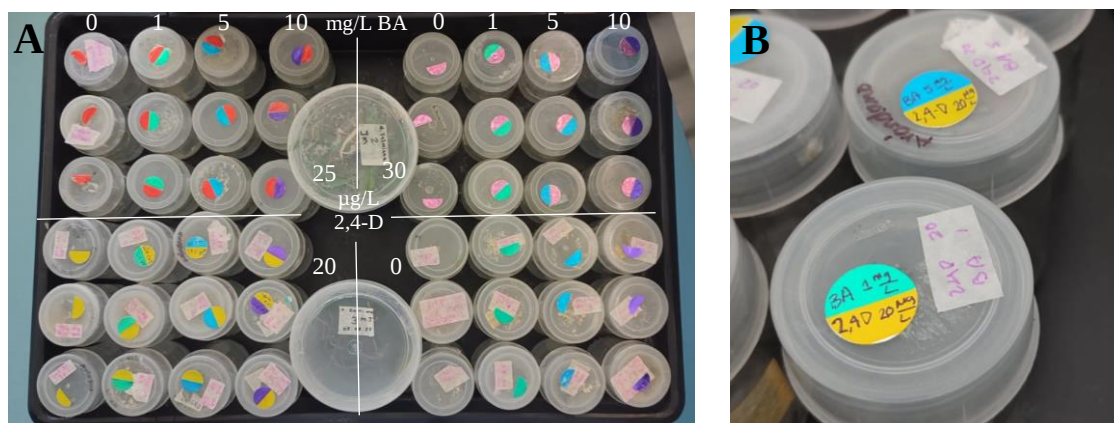


Figura 12. Diseño factorial A) Etiquetado de los 48 frascos sembrados. B) Código de color para la concentración de cada regulador

El sembrado de yemas axilares se realizó a partir de agaves *in vitro* para disminuir el riesgo de contaminación y se utilizaron pinza, bisturí y vidrio de corte previamente esterilizados para el procedimiento siguiente. Dado que algunos de los agaves del incubador aún eran de pequeño tamaño para los cortes a realizar y se seguían recolectando raíces para generar un botón celular apto para las laminillas, únicamente se sembraron explantes en 3 de los 5 frascos preparados para cada medio (1 explante por frasco).

Dentro de una campana de flujo laminar, se retiraron con las pinzas uno a uno los agaves disponibles, de su medio, se cortó sobre el vidrio la parte superior, para dejar explantes de 2.5 cm, se retiraron raíces y hojas secas. Seguido de ello, se realizó un corte longitudinal por mitad con el bisturí, y se repitió el proceso con las mitades, para tener cuartos de la plántula original, cuidando que en cada porción hubiera parte de la base con yemas.

Con las pinzas, se insertó uno de los explantes cortados en el medio de cada frasco, se taparon, cerraron con clean-pack y se llevaron los 48 frascos al incubador, sin apilarse para asegurar que recibieran la misma cantidad de luz (16 horas luz, 8 h oscuridad, a 25°C) (figura 13). Se revisaron periódicamente y los resultados finales de las yemas se muestran en resultados en la tabla 14.

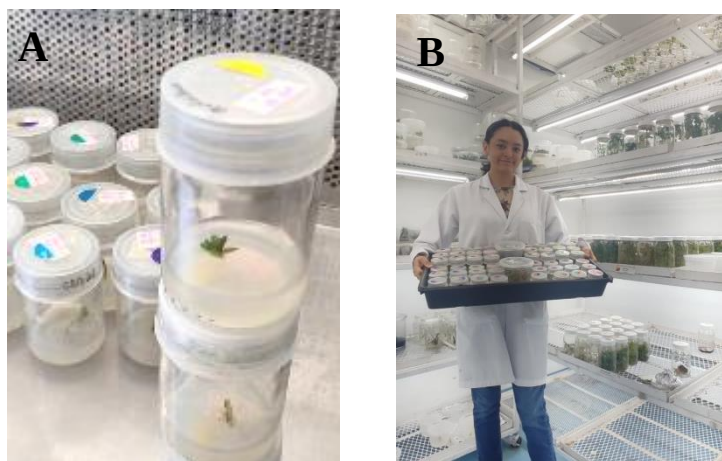


Figura 13. A) Explantes sembrados. B) Cuarto de incubación

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Micropropagación Agave geminiflora – germinación

La revisión de las semillas germinadas se realizó 3 semanas posterior a su siembra y no se observaron más cambios en cuanto a números después de ello. Los brotes eran de aproximadamente 1 cm de largo, color verde claro y grosor de alrededor de 3 mm. Los cambios que se vieron reflejados 3 semanas posterior a la primera revisión fueron la extensión de los brotes, también se pudo notar su adelgazamiento y cambio de color a uno más claro, ligeramente amarillo (figura 14). Se sugiere cambiar a un medio de rizogénesis que permita al brote anclarse al medio con la generación de raíz, así como obtener más nutrientes y fuente de carbono, ya que el medio de germinación está adicionado con solo un 10% de MS y sacarosa respecto a los medios para establecimiento de explantes.

El porcentaje de germinación obtenido fue de 26.2% considerando la totalidad de semillas sembradas, y se generó pérdida de 2 de ellas por contaminación fúngica, en el contenedor número 7 (tabla 13) Se observó que individualmente en los recipientes de cultivo en su mayoría germinó la tercera parte, $4/12$ semillas = 33.33%

Tabla 13. Germinación total de semillas de *A. geminiflora*.

Número de contenedor	Semillas germinadas	Fracción germinada	Porcentaje de germinación
1	1	1/12	8.3%
2	4	4/12	33.3%
3	3	3/12	25.0%
4	4	4/12	33.3%
5	4	4/12	33.3%
6	4	4/12	33.3%
7	2	2/12	16.7%
Total	22	22/84	26.2%

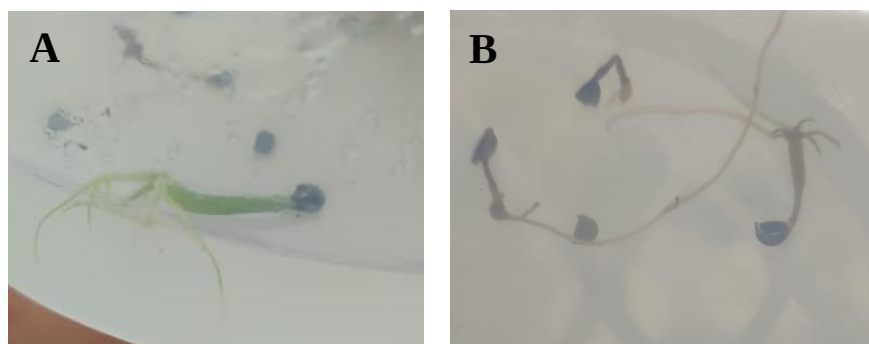


Figura 14. A) Brotes a las 3 semanas de revisión, vs B) Brotes en la última revisión

Micropropagación de A. attenuata - yemas axilares

Tras observar la contaminación por bacterias en los 4 explantes de *A. attenuata* sembrados y uno con presencia de hongo, se elaboró un nuevo medio de cultivo adicionado con nanopartículas de plata y preservativo-biocida. Sin embargo, a pesar de ello y de repetir la desinfección, los 4 cultivos de *attenuata* se contaminaron nuevamente al cabo de dos semanas con bacterias, y en las semanas posteriores se encontró también crecimiento fúngico, como se muestra en la figura 15, por lo que no se pudo visualizar ningún cambio propio del establecimiento del explante. El porcentaje de contaminación fue de 100%.

En ambos casos la contaminación se encontró en la base del explante, sugiriendo que la contaminación provenía directamente de la planta y no por exposición al ambiente durante

su siembra. Según se encontró en otros protocolos que logran realizar establecimiento *in vitro* de agaves, para prevenir esta contaminación se comienza por la germinación directa de semilla y con dicho material se realiza posteriormente establecimiento de yemas. No obstante, en la unidad de CIATEJ, no se cuenta aún con este recurso, debido a que el *Agave attenuata* no ha dado flor como fue el caso del *Agave geminiflora*.

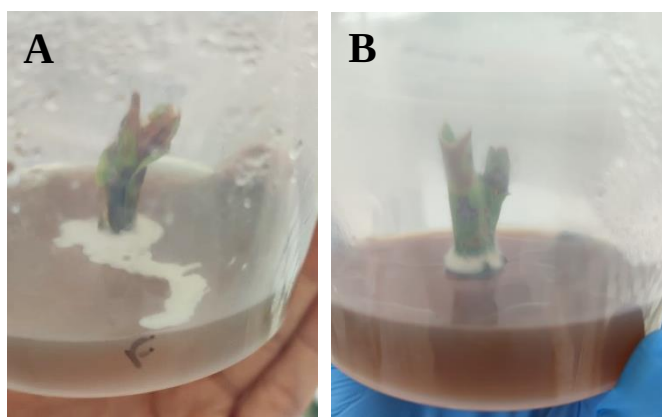


Figura 15. Evidencia de contaminación en medios con AgNp. A) Contaminación bacteriana. B) Contaminación fúngica

Micropropagación de A. salmiana - yemas axilares y diseño factorial

Los resultados del diseño factorial elaborado se encuentran en la tabla 14, donde se encontró que el tratamiento que permitió una mayor generación de brotes nuevos, 6 en total, fue la proporción del medio de cultivo 3A, con una concentración de 2,4-D de 25 $\mu\text{g/L}$ y sin BA. Esto se observa, además, al analizar individualmente el desempeño de cada regulador en todos los tratamientos, la más baja concentración de citocinina fue la que generó más brotes, 15, y la concentración de auxina que generó más brotes, 13, en conjunto con todos los tratamientos de dicha concentración fue de 25 $\mu\text{g/L}$ de 2,4-D. Un par de ejemplos de los brotes observados en el experimento se presentan en la figura 16.

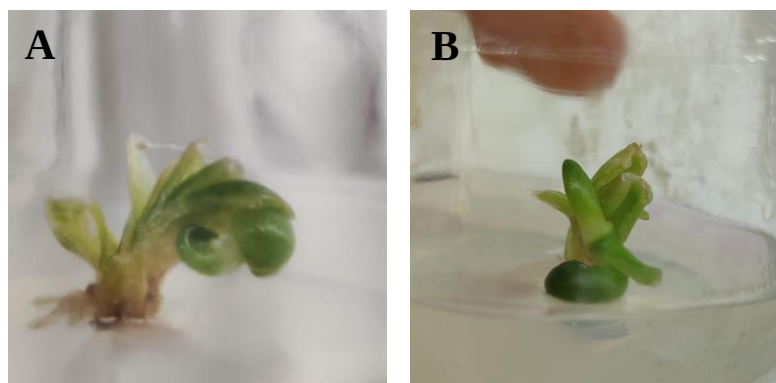


Figura 16. Acercamiento a nuevos brotes. A) Brotes tratamiento 2A B) Dos brotes del tratamiento 4D

Tabla 14. Recopilación del número de brotes de cada tratamiento en *A. salmiana*.

BA 2, 4-D		Citocininas				Total brotes
		0 mg/L	1 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	
Auxinas	0µg/L	3 1A	2 1B	5 1C	1 1D	11
	20µg/L	5 2A	2 2B	2 2C	1 2D	10
	25µg/L	6 3A	1 3B	3 3C	3 3D	13
	30µg/L	1 4A	0 4B	0 4C	2 4D	3
Brotes totales		15	5	10	0	

La concentración de BA que favoreció el número de brotes contrasta con la bibliografía, donde se reportan como sugeridas concentraciones de BA, entre 3 mg/L y 10 mg/L [12]. Se puede así mismo ver que retirar la citocinina del medio, en el tratamiento 2A, correspondiente a 0 mg/L de BA y 20 µg/L de 2,4-D, también generó un desempeño similar en el número de brotes, 5, cantidad que compite con el tratamiento 1C, que se asemeja más a lo reportado en otros estudios de micropropagación de otras especies de agave, 0 µg/L de auxina y 5 mg/L de BA.

Por la parte de las auxinas, se recomienda en diversos artículos [13] emplear concentraciones bajas, especialmente de ácido 2,4-D, que en ocasiones pueden actuar incluso como inhibidoras de crecimiento. Posterior al tratamiento 3A, se vio que el número de brotes era mayor en los tratamientos 1A, 1B, 1C y 1D, correspondientes a un contenido nulo de auxinas. De manera general, se observó este efecto de como conforme incrementó la concentración de auxina, se contaron menos brotes por explante sembrado, siendo mayormente notorio en la máxima concentración de ácido diclorofenoxiacético, 30 µg/L.

En contraste con la micropropagación de *Agave attenuata*, se logró mantener un porcentaje de contaminación baja para *A. salmiana* al emplear plántulas ya establecidas exitosamente *in vitro*. Únicamente se contaminó uno de los triplicados del tratamiento 1B, con bacterias, siendo el porcentaje de contaminación $1/48$ frascos = 2.08%, comparado con el 100% de los 4 explantes de *attenuata*. Por los tiempos de germinación, disponibilidad de material vegetal y problemas de contaminación, no se llegó a desarrollar enraizamiento y aclimatación *ex vitro* de las especies micropropagadas, lo que podrá desarrollarse en un PAP posterior para *A. salmiana* y *A. geminiflora*, a partir de los explantes establecidos y germinados.

Citogenética

Al realizar el conteo de las imágenes observadas a través del objetivo de 40x, se encontró que para las especies *A. attenuata*, *A. geminiflora*, *A. guiengola*, y *A. victoriae-reginae*, el número cromosómico fue de 60 (figuras 17A, 17B, 17C y 17D, respectivamente). Dado que el número cromosómico básico del género *Agave* es $x = 30$ cromosomas [16], reportado en estudios de especies varias, estas cuatro especies son de carácter diploide, $2n = 2x = 60$, y cuentan con dos juegos de cromosomas. En las bases de datos Chromosome Counts Data Bank (CCDB) e Index to Plant Chromosome Numbers (IPCN) solo se encontró registro de *A. attenuata* y *A. victoriae-reginae*, que coincide con los hallazgos de este PAP. Así mismo, se logró identificar los 5 pares de cromosomas grandes característicos de este género, que se encuentran explícitos en documentos de citogenética en otras especies de agaves, así como los 50 cromosomas pequeños [16], distinguibles en la figura 17.

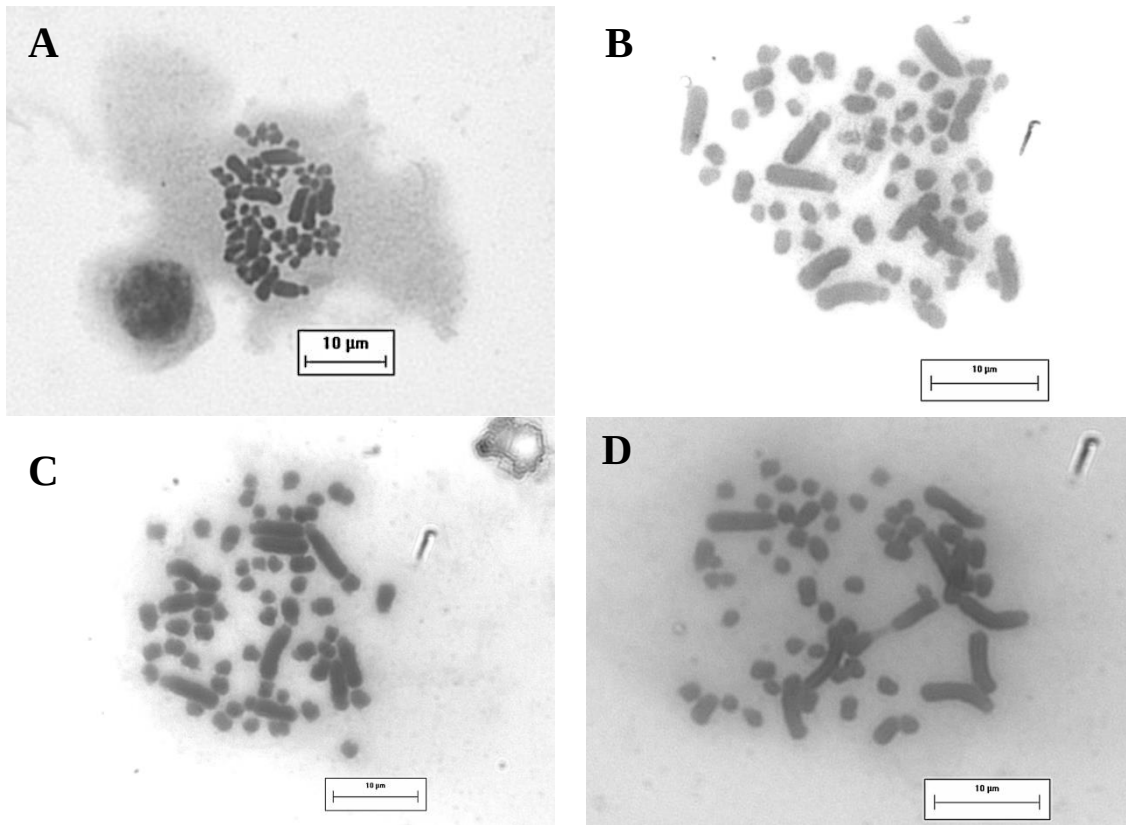


Figura 17. A) *A. attenuata* en 40X. B) *A. geminiflora* en 100X. C) *A. guiengola* 100X. D) *A. victoriae-reginae* en 100X

En *Agave salmiana* se realizó un conteo de 25 cromosomas grandes, sugiriendo una ploidía de 5 (figura 18). Siendo así, es de esperarse que el número total de cromosomas sean 150 ($2n = 5x = 150$), no obstante, en las imágenes obtenidas no se observan con claridad los cromosomas pequeños por presentarse en cantidad elevada y con una dispersión inadecuada. En ocasiones, por la proximidad del material genético condensado, no se logra distinguir claramente si se trata de un cromosoma distinto, o el brazo corto de un mismo cromosoma. Por observación, se distinguen entre las fotografías una cuenta dentro del rango de 131 y 177 cromosomas, con una mediana de 154 cromosomas y una media de 158, habiendo un porcentaje de error de 5.33% contra lo esperado de un agave pentaploide. El resumen de las cinco especies se muestra en la tabla 15.

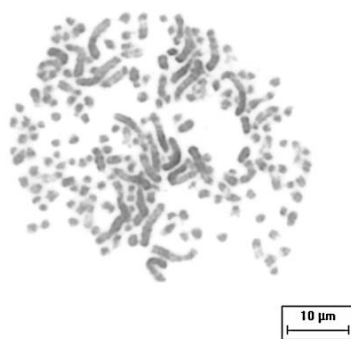


Figura 18. *Agave salmiana* visualizado en objetivo 40X

Tabla 15. Resumen de conteo cromosómico para las 5 especies de agave.

Especie	Numero básico	Ploidía	Cromosomas		
			Grandes	Pequeños	Totales
<i>A. attenuata</i>	x = 30	Diploide (2x)	10	50	2n = 2x = 60
<i>A. guiengola</i>					
<i>A. geminiflora</i>					
<i>A. victoriae-reginae</i>					
<i>A. salmiana</i>		Pentaploide (5x)	25	125	2n = 5x = 150

Adicionalmente, se encontró en *Agave geminiflora* evidencia de una endopoliploidía, fenómeno en que se genera la duplicación de ADN nuclear [17], sin llevarse a cabo división celular o del núcleo [18], mostrado en la figura 19. En la figura 19 se puede observar como el número de cromosomas se ha duplicado, además de encontrarse junto a sí los pares homólogos.

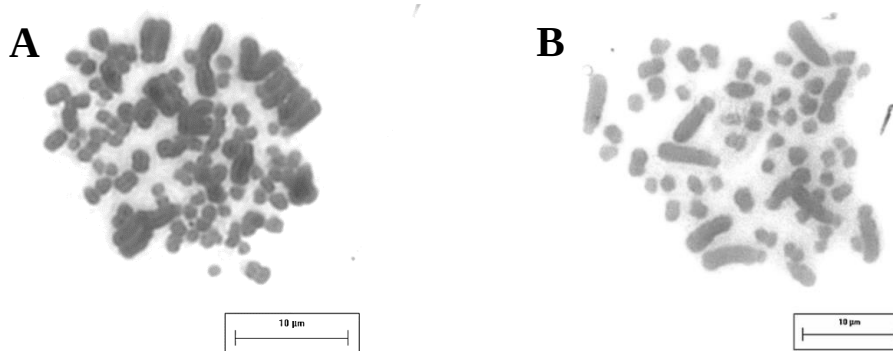


Figura 19. Comparación de una A) endopoliploidía en *A. geminiflora*, con apariencia 4n donde los cromosomas se encuentran próximos a su par homólogo, vs B) una mitosis común en esta especie.

Se realizó el idiograma de tres de las especies trabajadas, *A. attenuata*, *A. guiengola* y *A. geminiflora*, que se hallan completos en la sección de anexos. Por el detalle mencionado anteriormente con *A. salmiana*, no se pudo realizar la medición individual de sus cromosomas. Para el caso de *A. attenuata*, se observó en la experimentación que el material genético condensado y teñido en la laminilla sufrió una degradación tras guardarse en el refrigerador posterior a su evaluación con el objetivo de 40X. Al realizar nuevamente la revisión de los sitios marcados en el programa del microscopio para obtener las imágenes con el objetivo 100X y exportarlas a KaryoMeasure, ya no se encontraban definidas las metafases. Esto se puede observar en la figura 20.

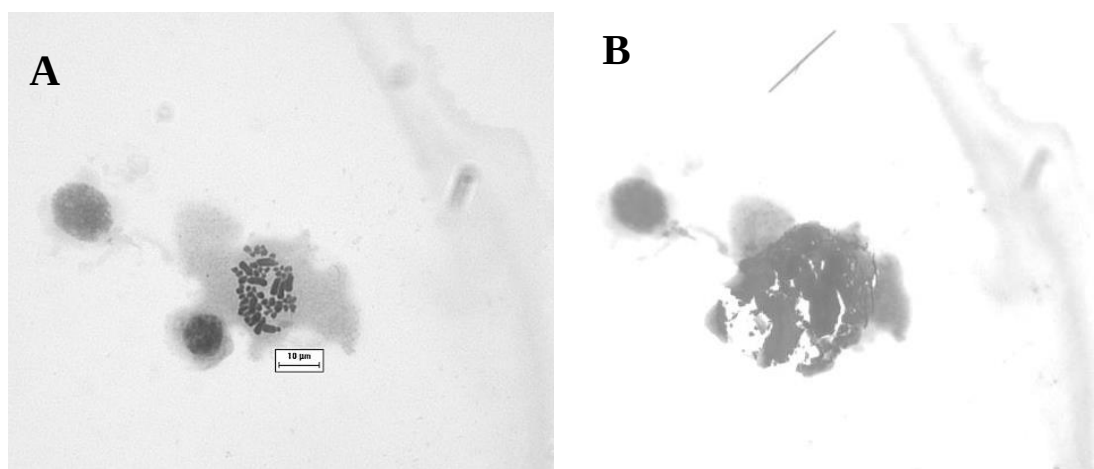


Figura 20. Comparación de la observación de un mismo campo en laminilla de *A. attenuata* (40X) A) evaluado tras realizar la tinción, donde se encuentra la metafase intacta, vs B) mismo sitio posterior a su conservación a - 4°C.

Posteriormente sería necesario verificar la condición de los botones celulares generados y si aún contienen suspensión celular suficiente para la elaboración de más laminillas, tanto de *A. attenuata* como de las otras especies. Esta verificación permitiría llevar a cabo el penúltimo de los objetivos específicos del proyecto, la hibridación *in situ* con ADN ribosomal, y agregar las bandas correspondientes a los idiogramas ya elaborados, así como elaborar los pendientes de a *A. salmiana* y *A. attenuata*.

Para futuros proyectos se contará ya con la facilidad de tener cuatro de las cinco especies, establecidas *ex vitro*, que están dando raíz nueva constantemente, tras haberles trasplantado a un sustrato favorable, y que ya no se encuentran en condiciones de estrés hídrico. Por otra parte, se cuenta ya con material *in vitro* de las especies *A. geminiflora* y *A. salmiana* que acelerarán futuros procesos, contando ya con este material y disminuyendo los riesgos de contaminación. Así mismo, ya se ha logrado identificar la ploidía de las especies que se encuentran en el centro de investigación, que resultará de utilidad para futuros investigadores y estudiantes que desarrollen proyectos de poliploidización (multiplicación de los juegos cromosómicos) como alternativa para el mejoramiento de estas cinco especies ornamentales.

1.7. Bibliografía y otros recursos

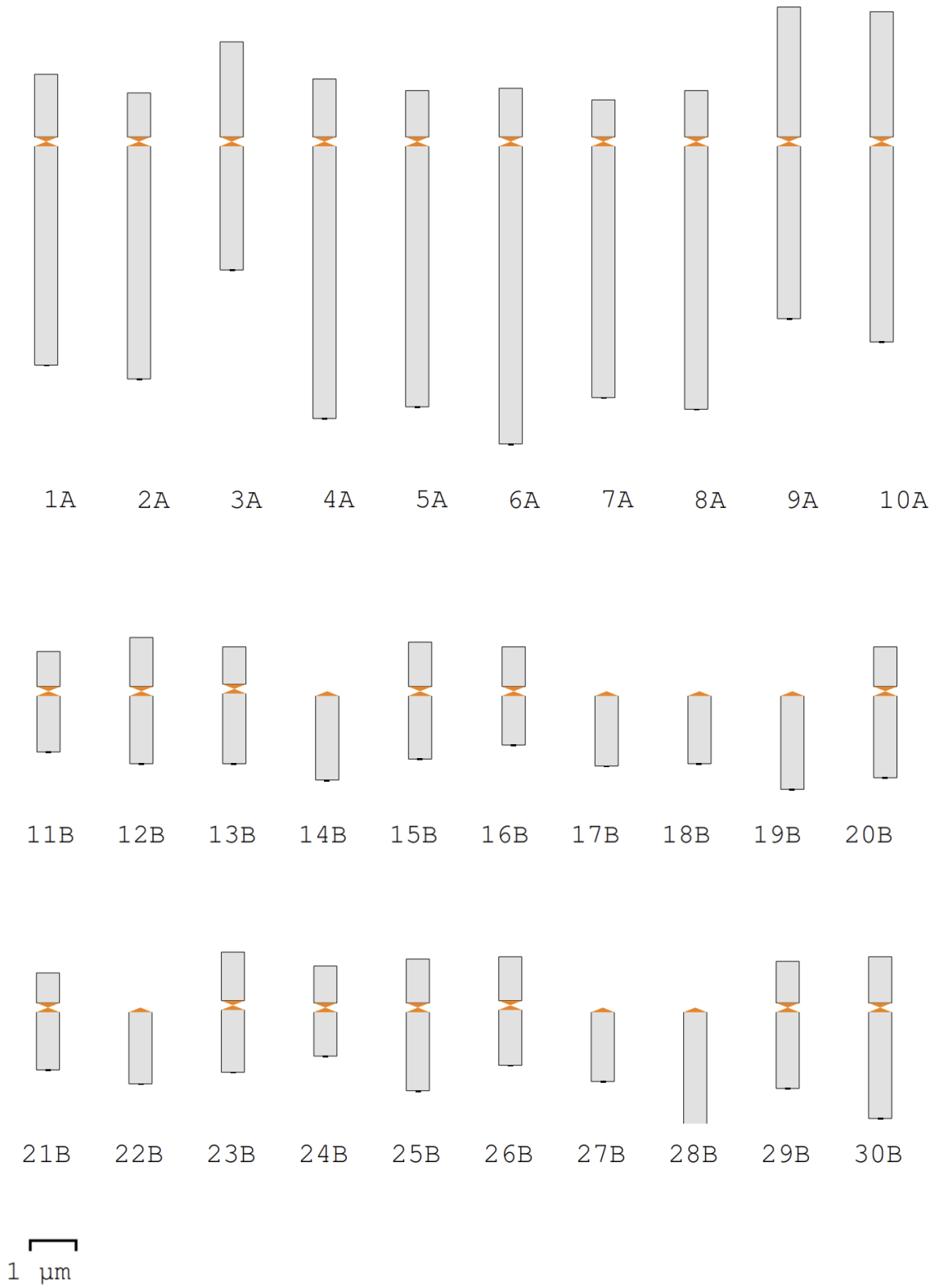
1. CIATEJ₁. (2023). *Biotecnología Vegetal*. Recuperado de: <https://www.ciatej.mx/investigacion/biotecnologia-vegetal>
2. CIATEJ₂. (2023). *Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible*. Recuperado de: <https://www.ciatej.mx/el-ciatej/quienes-somos>
3. T Morelo-Paredes, M Vilorio-Narváez, E Vilorio-Fernández. (2018). Inducción de poliploidía con colchicina en vitroplantas de Aloe vera (L.). Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. XX No. 1, pp. 97 – 105. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v20n1/0123-3475-biote-20-01-97.pdf>
4. JM Rodríguez-Domínguez, AB Gordillo-Tello, A Soto-Carrasquel, R Barba-González. (2016). Determination of chromosome number in two species of Agave collected in the state of Hidalgo, México. Sustainable and integrated use of Agave. Zapopan. Pp. 19 – 22. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Yordan-Martinez/publication/318323196_New_dietary_Supplement_from_Agave_fourcroydes_in_broiler_rabbits/links/5ee4eeaa92851ce9e7e0c066/New-dietary-Supplement-from-Agave-fourcroydes-in-broiler-rabbits.pdf#page=19
5. CIATEJ₃. (2023). *José Manuel Rodríguez Domínguez, Dr.* Recuperado de: <https://www.ciatej.mx/investigacion/investigador/jose-manuel-rodriguez-dominguez-dr>

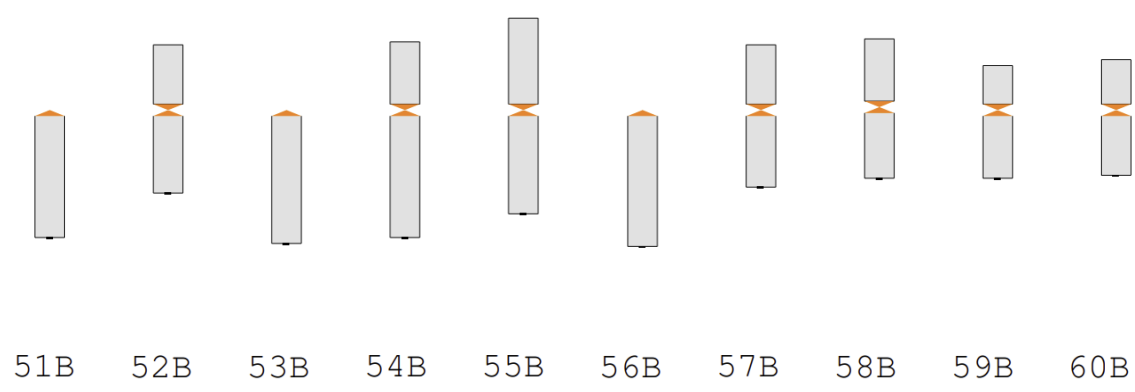
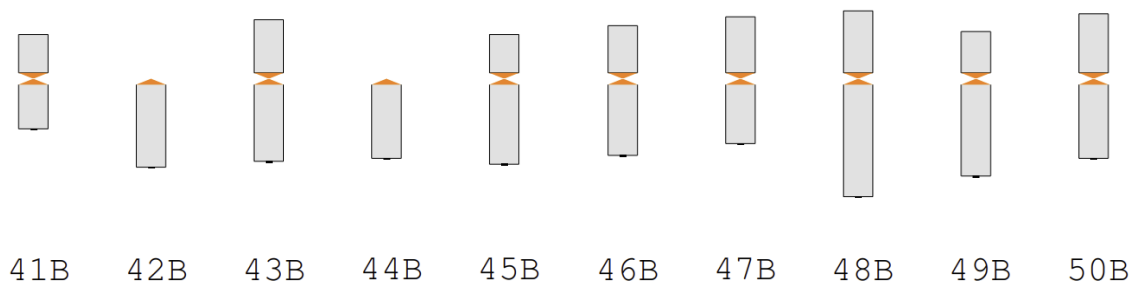
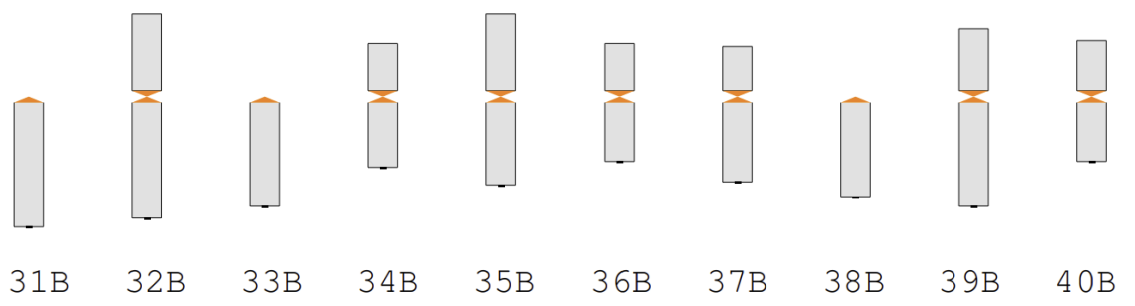
6. INIFAP. (2022). *Sustentabilidad del agave comercial por medio de su reproducción*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Recuperado de: <https://www.gob.mx/inifap/articulos/sustentabilidad-del-agave-comercial-por-medio-de-su-reproduccion?idiom=es>
7. A García. (2007). *Los agaves de México*. Ciencias 87, julio-septiembre, 14-23. Recuperado de: <https://revistacienciasunam.com/es/48-revistas/revista-ciencias-87/285-los-agaves-de-mexico.html>
8. L Portillo, F Santacruz-Ruvalcaba. (2004). Totipotencia celular: una revisión y aplicación del concepto. Scientia CUCBA. Vol 6. No. 1-2. Pp. 13 - 18. Recuperado de: http://www.floradejalisco.cucba.udg.mx/sites/default/files/publicaciones1/page_scientia_cucba/scientia_1.pdf#page=17
9. G Rios, N Añez, M Ramírez, B Bracho, D Araujo, H Suárez, J Nava. (2013). Cultivo in vitro de yemas, tratadas con benciladenina, provenientes de cormos enteros o seccionados de plátano ‘ cambur manzano. Bioagro, 25(2), 13-142. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612013000200007&lng=es&tlng=es.
10. J Rodríguez, J Castañeda, F Del Toro, A Gutiérrez, A Plaza. (2021). *Manual de Prácticas de Laboratorio para la Micropropagación de Plantas*. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
11. Berger. (2023). *Sustrato de cultivo de fibras de madera*. <https://www.berger.ca/es/sustrato-de-cultivo-de-fibras-de-madera/#:~:text=Los%20sustratos%20de%20NF%20Wood%20de%20Berger%20est%C3%A1n,Y%20naturalmente%2C%20los%20productos%20NF%20Wood%20son%20ecol%C3%B3gicos>.
12. LP Moreno. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. Agronomía Colombiana. Vol.27, No.2 Bogotá. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652009000200006
13. JM Rodríguez-Domínguez, LL Ríos-Lara, E Tapia-Campos & R Barba-Gonzalez (2017) *An improved technique for obtaining well-spread metaphases from plants with*

- numerous large chromosomes*. Biotechnic & Histochemistry, 92:3, 159-166, DOI: 10.1080/10520295.2017.1288927
14. F Santacruz-Ruvalcaba, JJ Castañeda-Nava, JP Villanueva-González, ML García-Sahagún, L Portillo, ML Contreras-Pacheco. (2022). Micropropagación de Agave maximiliana Baker por proliferación de yemas axilares. Polibotánica, (54), 139-151. Epub 12 de septiembre de 2022. Recuperado de: <https://www.scielo.org.mx/pdf/polib/n54/1405-2768-polib-54-139.pdf#:~:text=La%20micropropagaci%C3%B3n%20de%20Agave%20maximiliana%20es%20factible%20de,pero%20no%20as%C3%AD%20en%20el%20n%C3%BAmero%20de%20%C3%A9stas>
 15. C Puente-Garza, A Gutiérrez-Mora, S García-Lara. (2015). Micropropagation of Agave salmiana: Means to Production of Antioxidant and Bioactive Principles. Frontiers in Plant Science. Researchgate. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/284434175_Micropropagation_of_Agave_salmiana_Means_to_Production_of_Antioxidant_and_Bioactive_Principles
 16. G Palomino, Guadalupe, J Martínez, I Méndez. (2010). Análisis del tamaño del genoma y cariotipo de Agave akites Gentry (Agavaceae) de Sonora, México. Revista mexicana de biodiversidad, 81(3), 655-662. Recuperado de https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-34532010000300006
 17. JM Rodríguez-Domínguez, S Camacho-Alvarado. (2020). Detection of endopolyploid cells in root tips from two geophytic species pretreated with α -bromonaphthalene. International Society for Horticultural Science (ISHS) Acta Horticulturae 1288: IX International Symposium on New Ornamental Crops. Recuperado de: https://www.actahort.org/books/1288/1288_18.htm
 18. J Benítez. (2023). Endopoliploidia – Endopolyploidy. Instituto Roche. Recuperado de: <https://www.institutoroche.es/recursos/glosario/endopoliploidia>

1.8. Anexos generales

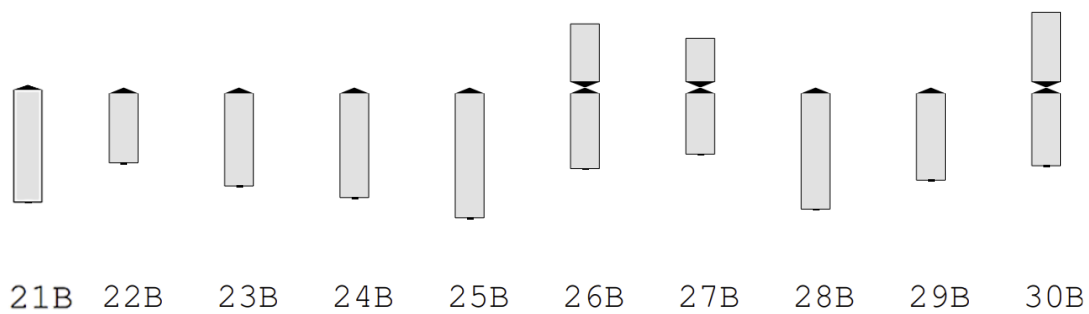
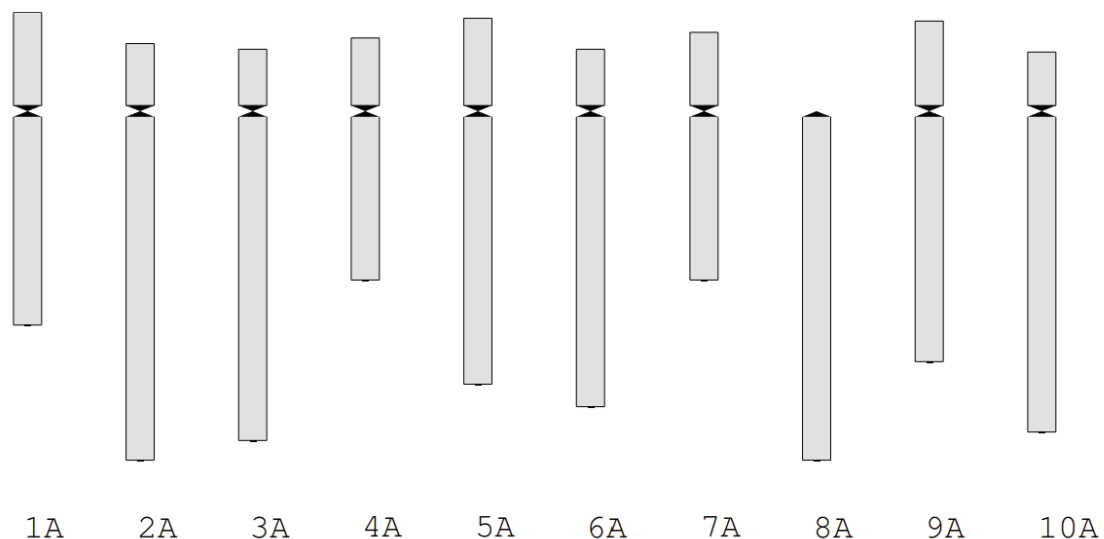
Idiograma - A. guiengola



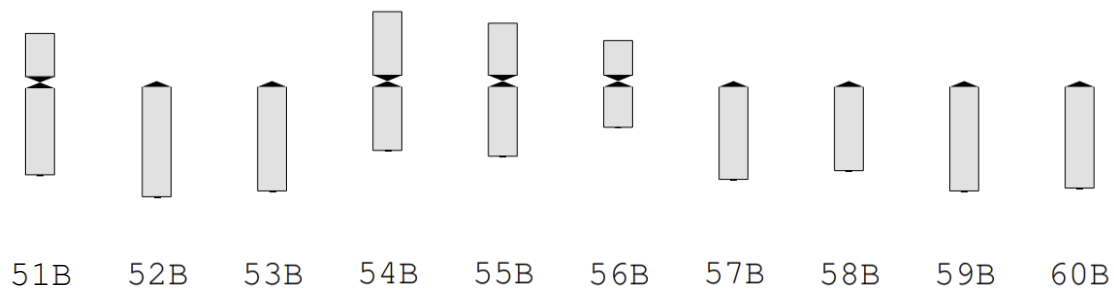
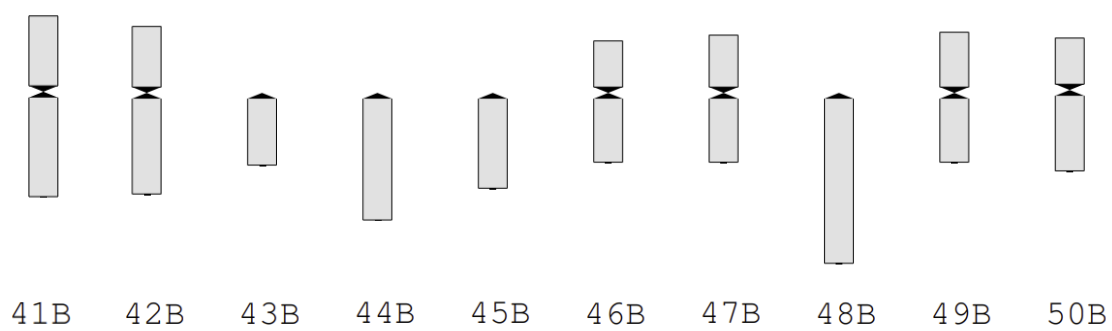
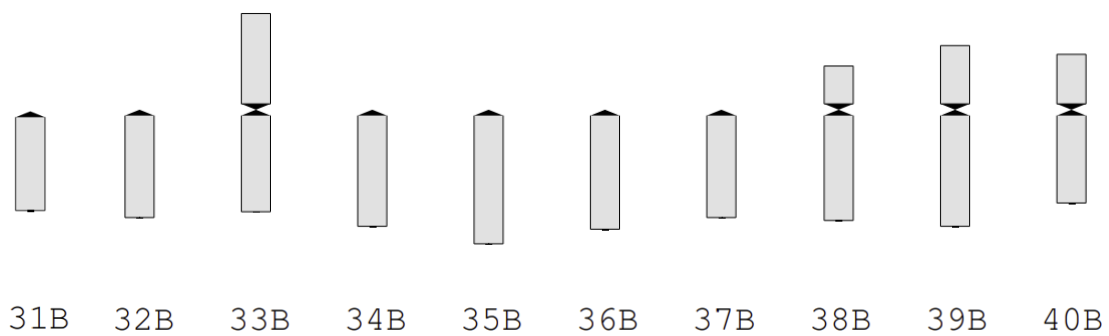


1 μm

Idiograma - A. geminiflora

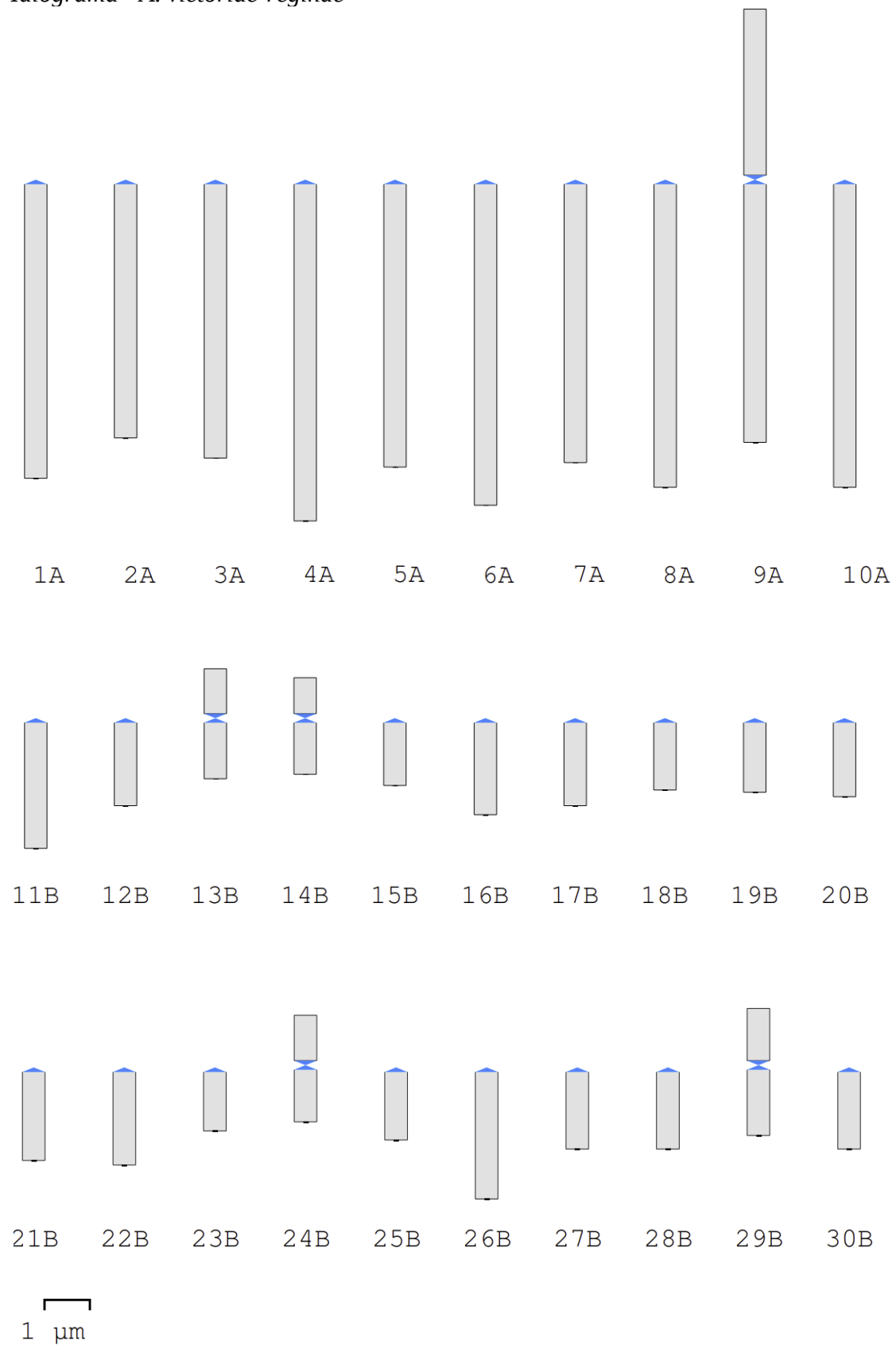


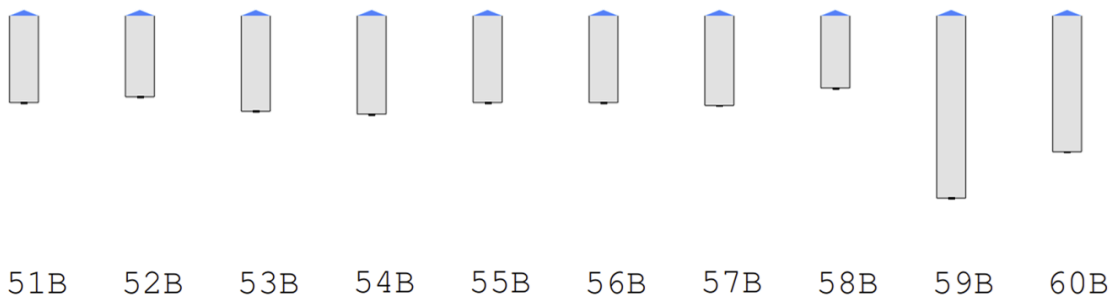
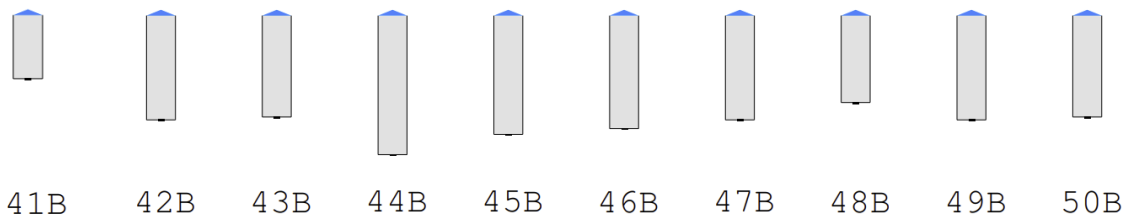
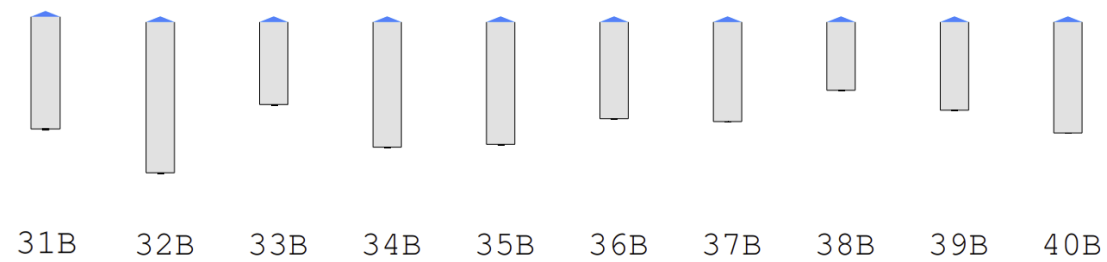
1 μ m



1 μm

Idiograma - A. victoriae-reginae





1 μm

2. Productos

Ficha descriptiva: Estrategia de micropropagación de Agave salmiana

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Micropropagación y caracterización citogenética de cinco especies de agave: <i>Agave guiengola</i> , <i>Agave geminiflora</i> , <i>Agave attenuata</i> , <i>Agave salmiana</i> y <i>Agave victoriae-reginae</i> en el CIATEJ
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Se elaboró un diseño de experimentos, donde se rescatan las concentraciones óptimas de auxinas y citoquininas para la micropropagación de <i>Agave salmiana</i> , para la generación del mayor número de brotes, como una estrategia para optimizar recursos y acelerar la obtención de nuevos brotes; con el fin de incrementar la población de esta especie <i>in vitro</i> cuando se requiera su uso otros protocolos. La proporción de reguladores de crecimiento es de 25 µg/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético y 0 mg/L de 6-bencilaminopurina.
Autores:	Vanessa Nataly Magaña Avalos

Ficha descriptiva: Documento de idiogramas del género Agave

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Micropropagación y caracterización citogenética de cinco especies de agave: <i>Agave guiengola</i> , <i>Agave geminiflora</i> , <i>Agave attenuata</i> , <i>Agave salmiana</i> y <i>Agave victoriae-reginae</i> en el CIATEJ
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Se generó un documento con los idiogramas de <i>A. geminiflora</i> , <i>A. guiengola</i> y <i>A. victoriae-reginae</i> , para caracterizar citogenéticamente en una primera etapa las especies de agaves en CIATEJ, proveyendo conocimiento de su ploidía para posteriores ensayos de modificación genética o poliploidización. Disponible en la sección de anexos del presente documento.
Autores:	Vanessa Nataly Magaña Avalos

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

Para mí fue frustrante observar la pérdida de un gran porcentaje de material vegetal sembrado, debido principalmente a problemas por contaminación, tanto de mi trabajo como el de otros estudiantes e investigadores, que a pesar de realizar modificaciones en el proceso persistía este obstáculo. De igual modo, durante mi participación en la unidad de

biotecnología vegetal del CIATEJ, el desarrollo de este proyecto dependió en gran medida del material vegetal disponible, así como su capacidad de crecimiento, que en algunos procedimientos fue motivo para optar por metodologías diferentes y otras ocasiones no se pudieron culminar todos los objetivos planteados. Esto me adentra a la perspectiva de los productores, que de igual modo dependen de las circunstancias y disponibilidad de ejemplares sanos para continuar con sus labores de cultivo. Comprendo cómo el carecer de este recurso les limita, y que además conlleva una espera considerable de tiempo para obtener los resultados esperados.

Rescato con admiración la responsabilidad demostrada por la comunidad del CIATEJ que a través de cada miembro me permitió ver el compromiso que existe en formar un espacio sano, de colaboración y profesionalismo. Desde mantener una buena comunicación institucional dentro y fuera de las instalaciones, programar horarios para limpieza y atención de las áreas comunes, informar sobre convocatorias de interés, o si se encontraban irregularidades y fomentar el respeto al trabajo del otro, entre otras acciones observadas, me enorgullecen el haber formado parte de este equipo. Relativo al contexto de la pandemia, a pesar de que no se solicitaba de forma directa portar cubrebocas, por responsabilidad social la mayoría de los miembros de la unidad vegetal, así como yo, lo utilizamos en la medida de lo posible.

Para ello fue importante ser consciente de mi espacio de trabajo, que es el espacio de otros, para cuidarme a mi y los demás. Procuré esto al limpiar después de utilizar alguna mesa, lavar todo el material usado y regresarlo a su lugar, para que este esté disponible para los demás; informándome sobre la correcta disposición de residuos para cuidar del ambiente así como de las personas involucradas en la recolección de residuos.

Soy consciente que cualquier proceso involucra la participación de otras personas, tanto en el espacio físico del laboratorio, donde se comparte un mismo espacio e instrumentación, como en el aspecto teórico del desarrollo de un proyecto. Para llegar a las metodologías empleadas se requirió la contribución de una numerosa cantidad de investigadores, cuyos trabajos, presentados en la bibliografía, sustentan lo desarrollado en este PAP. Así mismo,

fue esencial la mentoría del investigador y director de este PAP, el Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez, a quien agradezco su disposición y entrega en el asesoramiento de este proyecto, así como al personal del CIATEJ que me orientó en los momentos en que lo requerí. Por último, agradezco al Laboratorio Nacional PlanTECC por el apoyo otorgado para realizar la presente investigación.

3.2 Aprendizajes logrados

Fue un reto tratar de encontrar la manera de lograr la dispersión adecuada de cromosomas en cada especie, requirió de autoaprendizaje y razonamiento lógico para proponer adecuaciones, sí como consulta con el Dr. Manuel Rodríguez. Con la programación de una jornada de experimentación dedicada exclusivamente a este procedimiento, observando las muestras en microscopio y realizando al momento una nueva laminilla con las modificaciones que se consideraran pertinentes, fue la manera en que se pudo conseguir los resultados mostrados en el presente documento.

Reforcé la virtud de la paciencia, sobre todo en aquellos procesos biológicos que conllevan un tiempo determinado y que a la par se debe aprovechar para continuar con otros procesos, ya sea experimentales o de investigación. Para eso tuve que desarrollar un sentido de planeación con anticipación para agendar el uso de campanas de flujo laminar y preparar el material necesario, instrumentos estériles o medios de cultivo, previo a su implementación y aprovechar el tiempo de manera eficiente.

Fue muy valioso para mí el poder poner a prueba mis propuestas en el desarrollo de cada procedimiento para obtener mejoras y generar progresos; como lo fue el cambiar la tierra de las plántulas *ex vitro* por un sustrato más ligero para comenzar a generar raíz. También lo pude aplicar al adecuar el uso de ácido acético en las laminillas y realizar ese procedimiento de manera más ágil e intuitiva, ya que era un procedimiento totalmente desconocido para mí hasta este periodo. Así mismo aprendí a manejar el equipo de microscopía, ubicar e identificar con mayor facilidad las metafases, algo que en principio me costó trabajo y en ocasiones ignoraba cuando estaba observando cromosomas en el microscopio, especialmente

porque existía variación significativa en la apariencia entre la primera especie que se revisó en conjunto con el investigador responsable y las que desarrollé posteriormente de manera individual.

Es por ello que para mí fue esencial mantener una buena comunicación con el director de mi proyecto para revisar resultados progresivamente conforme se fueron obteniendo y discutir los siguientes pasos a desarrollar o bien cambios a adecuar de ser necesario. No obstante, la comunicación no se limita al director responsable. Al compartir equipos, material y espacio con otros estudiantes y doctores fue importante poder comunicarme ya fuese de forma verbal o escrita con otros para pedir asesoramiento, la realización de algún procedimiento en conjunto, programar el uso de algún equipo o instrumento, entre otros.

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 a su relevancia.	Conocimientos	Conocimientos de cinética para modelar un proceso	He desarrollado en equipo proyectos para evaluar el crecimiento de organismos, así como el secado de productos.	Realizar predicciones del comportamiento de un proceso o comparaciones con parámetros en común.	
		Bases de biología molecular para la transformación de bacterias proponiendo vectores y termogramas; así como evaluación de resultados por cultivo y electroforesis.	HE realizado proyectos conceptuales, así como experimentación en los laboratorios de Biología Molecular Aplicada e Ingeniería Genética y Regulación	Para optimizar un proceso o alguna cualidad de un producto a través de la modificación genética de algún organismo	
		Principios de diseño	Cursé un año de la carrera de Diseño Industrial, así como tomados cursos aparte. Lo apliqué al modelado de un biorreactor 3D y exposiciones de clase.	Para realización de planos y diseño de objetos, así como presentaciones con la información más relevante de forma atractiva para la audiencia.	
		Biología celular, inmunología y cultivos animales y vegetales	Realizado proyectos teóricos y prácticos en dichas asignaturas.	Comprender los procesos de transporte de moléculas a través de membrana, así como la conformación de tejidos y comunicación intercelular.	
	Habilidades	Hablar en público	He conducido y participado en eventos extra-académicos así como realizado exposiciones de clase desde temprana edad.	Para tener una efectiva comunicación en un equipo y transmitir conocimientos, propuestas o descubrimientos a otros.	
		Creatividad	Propongo ideas o alternativas en proyectos para abordar problemas de manera distinta o lograr un objetivo desde otro enfoque	Para generar soluciones diversas que pueden ser más efectivas o viable o facilitar algún trabajo.	Aprendí un nuevo estilo de referenciación y la integración de citas en IEEE. Realicé por primera vez estudios citogenéticos y aprendí las bases químicas, físicas y biológicas que hacen posible la visualización de cromosomas condensados y dispersos en microscopía.
		Facilidad de trabajo manual	Realización de proyectos manuales y prototipos en diversas asignaturas y proyectos personales.	Adecuado manejo de muestras y equipo de laboratorio, para procurar las buenas prácticas de laboratorio, prevenir accidentes y contaminación.	Mejoré mi capacidad de síntesis y de comunicación verbal y escrita, principalmente para la elaboración de una presentación pública. Potencialicé mi conocimiento en microscopía mejorando mi capacidad de endoque de los objetivos.
		Atención al detalle	Revisar a profundidad las entregas.	Encontrar las palabras adecuadas para una comunicación asertiva, ser observador de los alrededores para identificación de riesgos y oportunidades y realizar propuestas en base a ellos.	
	Actitudes	Adaptabilidad a distintos ambientes y formas de trabajo.	He podido vivir por determinados periodos en otros países adaptándome a su cultura y costumbres; así como convivir con personas de distintos contextos.	Entrar a un nuevo ambiente de trabajo o equipo, aprender rápido su forma de trabajo para poder colaborar efectivamente.	
		Curiosidad por aprender	Participo en clase para hacer más preguntas del tema y rentar libros en la biblioteca para apoyarme en conocimientos adicionales; así como buscar información en internet de temas que despierten mi interés o solo por aclarar dudas.	Buscar alternativas para soluciones, tener genuino interés en un proyecto para poder participar activamente y mantener una buena disposición de trabajo.	
		Empatía y servicio a los demás	Suelo apoyar a los demás cuando detecto que podrían necesitarlo. He participado en voluntariados, entendiendo lo que otros necesitan de mí y la manera óptima de trabajo.	Entender a los demás, su forma de trabajo y colaborar de mejor manera en un entorno; así como fortalecer la confianza de un equipo.	