

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 Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Micropropagación y estudios citogenéticos en cinco especies de agave en
CIATEJ Zapopan

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes
Ingeniería en Biotecnología. Sofía Anahí Real Covarrubias

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.....	5
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto	6
1.2 Caracterización de la organización.....	7
1.3 Identificación de la(s) problemática(s)	8
1.4. Planeación de alternativa(s).....	10
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	15
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	30
1.7. Bibliografía y otros recursos	33
1.8. Anexos generales	41
2. Productos	42
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	44
3.1 Sensibilización ante las realidades	44
3.2 Aprendizajes logrados	45

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 PAP “Micropropagación y estudios citogenéticos en cinco especies de agave en CIATEJ Zapopan” es una expansión del proyecto en el que se trabajó en el semestre de primavera 2023. El objetivo era trabajar con distintos individuos del género *Agave spp.*: realizar análisis citogenéticos en dos especies, la micropropagación de tres variedades y el análisis de meiosis de un espécimen.

Se llevó a cabo el análisis citogenético de *Agave attenuata* y *Agave guiengola* fijando los cromosomas y utilizando la tinción fluorescente DAPI para contabilizarlos. En la micropropagación *in vitro* se utilizaron técnicas distintas para cada especie: germinación de semillas para *A. chazaroii*, establecimiento de explantes para *A. geminiflora*, y enraizamiento de *A. applanata*, en esta última se utilizaron tres medios de cultivo distintos para determinar cuál era el más adecuado. El estudio de la meiosis se efectuó en células germinales de polen de *A. geminiflora* utilizando aceto-orceína para teñirlas, asimismo se evaluó la viabilidad del polen maduro tiñendo los granos con azul de lactofenol y valorando el desarrollo de tubo polínico.

Se adecuó la técnica de fijación de cromosomas para cada especie trabajada y se encontró que *A. attenuata* cuenta con 5 pares de cromosomas grandes y 25 pares pequeños. Se estableció que la viabilidad de polen de *A. geminiflora* es de 95% y que su porcentaje de germinación es de 44.6%, no obstante, es necesaria más investigación. Finalmente, se concluyó que el medio más adecuado para el enraizamiento de *A. applanata* era el suplementado con ácido indol-3-butírico

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 Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), pertenece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y es un centro interdisciplinario donde se realizan actividades enfocadas a la investigación, el desarrollo tecnológico y la innovación [1]. En la sede Zapopan del CIATEJ, se encuentran los departamentos de Biotecnología Vegetal, Biotecnología Industrial y Tecnología Alimentaria [2].

El presente proyecto se desarrolla de manera experimental en el departamento de Biotecnología Vegetal donde se trabaja en áreas de bioquímica, agronomía, biología molecular y genética. En este PAP se aspira a obtener información citogenética de cinco especies de agave, pues no existe registro de ellas. Asimismo, se efectuará la micropropagación de estas especies para obtener la mayor cantidad posible de individuos de alta calidad de manera uniforme, para poder así continuar con su análisis en periodos posteriores.

Objetivo general

- Efectuar estudios genéticos de dos especies de agave para crear un recopilado de su información cromosómica, realizar la micropropagación de tres especies para poseer el material vegetal necesario para futuras investigaciones y, además, llevar a cabo el análisis de la meiosis de una especie para observar las implicaciones que tiene en su viabilidad.

Objetivos específicos

- Efectuar estudios de citogenética en *A. attenuata* para hacer un conteo cromosomal.
- Realizar el análisis de la meiosis en células germinales de polen de *A. geminiflora*, para identificar los efectos que puede tener el proceso en la viabilidad de polen.
- Micropropagar especímenes de *A. chazaroi* y de *A. geminiflora* a través de germinación *in vitro*, para contar con especímenes para análisis futuros.
- Llevar a cabo el enraizamiento *in vitro* de *A. applanata*, para seleccionar el medio adecuado para esta técnica de micropropagación.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

Los individuos de la familia *Agavaceae* son uno de los recursos naturales más importantes para México, tanto desde un punto de vista económico y social como agroecológico [3]. Los agaves son materia prima para distintos productos de la vida cotidiana, como alimentos (*A. salmiana*), fibras (*A. sisalana*), y bebidas (*A. tequilana*), además son fuente de biomasa para producir combustibles [4]. Asimismo, hay otros agaves que son altamente apreciados como plantas ornamentales, entre ellos *A. victoriae-reginae* y *A. attenuata*.

Debido al cambio climático, los agaves están ganando importancia por su capacidad de soportar altas temperaturas [5], no obstante, la demanda de grandes cantidades de plántulas saludables y de calidad es muy alta, por lo que la oferta no es suficiente. Esto se debe a que, a pesar de que los agaves producen semillas, las plantas tardan demasiado tiempo en tener la madurez y el tamaño necesario para su distribución, las especies pequeñas tardan aproximadamente entre 4 y 5 años [6].

La mayoría de los individuos de la familia *Agavaceae* son propagados mediante vástagos desarrollados en rizomas alrededor de la planta madre y mediante bulbos en la inflorescencia en caso de que la planta falle en la producción de semillas [4]. Para lograr satisfacer la demanda, se plantea la utilización de técnicas de micropropagación para esta especie. La micropropagación no sólo permitiría producir mayor cantidad de plantas durante todo el año y en pequeñas áreas de trabajo [4], sino, además estarían libres de patógenos y serían

uniformes en edad y tamaño, lo que a su vez favorecería el desarrollo de cultivos homogéneos, facilitando el proceso de cosecha [7].

La diversidad biológica de la familia *Agavaceae* es sinónimo de diversidad genética. Conocer la información genética de una especie permite comprender su capacidad de dispersión, sus mecanismos de reproducción, los mecanismos de cruzamiento, la deriva genética, y su respuesta a la selección natural [8]. Sin embargo, el conocimiento actual que se tiene sobre el genoma de los agaves es escaso, convirtiéndose en una barrera para la experimentación y la búsqueda de mejoras, pues es imposible manipular los genes que no se conocen.

En el actual proyecto de otoño 2023, se continúa con las investigaciones realizadas en el PAP del periodo Primavera 2023. Durante el proyecto pasado se trabajó de manera similar, no obstante, se usaron las especies *A. guiengola*, *A. geminiflora* y *A. attenuata*, pero en lugar de *A. chazaroi* y *A. applanata*, se utilizó *A. salmiana* y *A. victoriae-reginae*. A diferencia del presente proyecto, la micropropagación se realizó empleando yemas axilares en lugar de explantes, se adaptaron *ex vitro* los individuos obtenidos y se obtuvo tanto el cariotipo y como el idiograma de las especies utilizadas.

1.2 Caracterización de la organización

El presente PAP se desarrolla en el CIATEJ, cuya misión es ser un centro público de investigación que impulse el desarrollo sostenible de la sociedad a través de la generación de conocimiento, formación de talento y aplicación de ciencia y tecnología [9]. Al mismo tiempo, su visión es ser una organización que fomente tanto el conocimiento como la innovación tecnológica a través de redes de colaboración nacionales e internacionales y alianzas con el sector público y privado con el fin de contribuir al desarrollo sostenible de la sociedad [9].

Además de las actividades de investigación, el CIATEJ ofrece servicios de formación de recursos humanos, maestrías y doctorados, de educación continua, capacitaciones, iniciación a la investigación, estancias y tesis de pregrado [10]. Esto se realiza con la finalidad de

ofrecer soluciones que contribuyan a la competitividad en sectores agropecuarios, alimentos y bebidas, salud animal y humana, medio ambiente y energía sustentable [10].

El CIATEJ cuenta con una sede, CIATEJ Guadalajara y tres subsedes: Zapopan, Sureste y Noreste, las que a su vez se dividen en 5 áreas: Biotecnología Vegetal, Tecnología Ambiental, Tecnología Alimentaria, Biotecnología Industrial y Biotecnología médica y Farmacéutica [11]. Como se mencionó anteriormente, el PAP se lleva a cabo en la subsede Zapopan, localizada en Camino Arenero 1227, El Bajío, Zapopan, Jalisco, en el departamento de Biotecnología Vegetal. Este departamento es dirigido por la Doctora Antonia Gutiérrez Mora y está dedicado al sector agrícola, agropecuario y agroindustrial con el objetivo de contribuir al incremento de sus ventajas competitivas en el mercado actual [2].

Las líneas de investigación que se desarrollan en el departamento de Biotecnología Vegetal son Fitoquímica y Biocompuestos, Fitopatología, Mejoramiento Genético Vegetal y Micropropagación de Especies Vegetales. Dentro del equipo de investigadores se encuentra el Doctor José Manuel Rodríguez Domínguez, quien es el responsable del presente PAP [2]. El Doctor Rodríguez estudió la licenciatura en Biología y la maestría en Ciencias de Procesos Biotecnológicos en la Universidad de Guadalajara, además realizó el Doctorado en Ciencia y Tecnología en Biotecnología Reproductiva en el CIATEJ. Actualmente trabaja en el área de micropropagación y mejoramiento genético de agaves y especies ornamentales [12].

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

La familia *Agavaceae*, a la cual pertenecen los agaves, es endémica de América. Los agaves son plantas perennes que pueden ser encontradas en casi todos los biomas de nuestro país. En México crecen 150 de las 200 especies conocidas de las cuales 58% son endémicas [13]. Los agaves son de los grupos de plantas más relevantes para nuestro país, pues han sido aprovechados durante miles de años para la obtención de distintos productos y beneficios. [14]. Algunos de ellos son la obtención de alimento, fibras, forraje, medicamentos, construcción y elaboración de bebidas alcohólicas, como el mezcal, pulque y tequila [15].

Debido a las características peculiares del agave, se han reportado distintos esfuerzos en México y el mundo para obtener su información genética, pues el análisis de la variación genética entre sus poblaciones es esencial para su conservación y la creación de programas de mejoramiento genético. A su vez, estos programas aportan información necesaria para el monitoreo del germoplasma y son útiles para predecir potenciales ganancias genéticas [15]. Conocer y comprender la variabilidad genética de una especie permite determinar su riqueza y distribución y planear estrategias de aprovechamiento y conservación. Asimismo, permite disminuir pérdidas causadas por patógenos, especies invasoras o por la introducción de variedades modificadas genéticamente [8] .

No obstante, si se compara con la cantidad de información genética que existe de otras especies, la información que se tiene de la familia *Agavaceae* es bastante reducida, lo que limita las posibilidades de desarrollo de nuevas investigaciones. Es por esto que una de las metas de este proyecto es contribuir a ampliar la biblioteca genómica de *Agave spp.*, con enfoque en *Agave chazaroi*, *Agave victoriae-reginae*, *Agave geminiflora*, *Agave attenuata* y *Agave guiengola*. De estas, tan sólo existe una cantidad mínima de información genética sobre *Agave victoriae-reginae* [16], *Agave attenuata* [17] y *Agave guiengola* [18].

Los agaves se pueden reproducir de manera sexual o asexual según la especie, aunque también producen semillas de manera abundante [19]. El método asexual por hijuelos jóvenes derivados de rizoma es el más usado pues es el de mayor éxito. Sin embargo, el ciclo vital de la planta inicia con la germinación de la semilla y el establecimiento de la plántula, hasta que muere después de formar semillas, proceso que puede durar de entre 15 a 20 años si existen las condiciones adecuadas [20].

Debido al prolongado ciclo de vida del agave y de la creciente demanda de estas plantas, se proponen técnicas de propagación para solucionar esta situación. Una técnica es la micropropagación, que permite producir una cantidad relativamente alta de plantas por año en espacios pequeños [4], además de generar e introducir variaciones genéticas que serán observables en un periodo menor de tiempo en comparación de la propagación natural [21].

Adicionalmente, la micropropagación de agave se realiza en condiciones de esterilidad, lo que asegura que las plantas crecerán libres de patógenos, reduciendo a su vez la propagación de enfermedades entre cultivos [7]. De igual manera, la producción de agaves es uniforme en edad y tamaño, resultando en plantaciones homogéneas que facilitan y optimizan el proceso de cosecha [7]. Conociendo esto, se destaca la importancia de la micropropagación de especies de agave endémicas de nuestro país, pues no sólo permite conservar aquellas que están en peligro de extinción, sino que, a su vez, potencia la producción de especies útiles para la industria y permite tener el material vegetal suficiente para su estudio.

1.4. Planeación de alternativa(s)

Como se menciona anteriormente, es importante conocer la variación genética del agave para diseñar estrategias de conservación y llevar a cabo programas de mejoramiento genético. Los análisis citogenéticos se basan en el estudio del patrón de bandas formado por los cromosomas durante la metafase del ciclo celular [22]. Para hacerlo, se necesitan técnicas que permitan obtener extendidos cromosomales de calidad, los cuales son útiles para conteo cromosómico, hibridación in situ, cariotipos y construcción de ideogramas [23]. Los tres métodos principales para la obtención de cromosomas extendidos son el *squashing*, el *smearing* y el *dropping* [24].

Para el método de *squashing*, las células a analizar son sometidas a un pretratamiento que detiene la mitosis en la metafase, después se fijan los cromosomas, se hace una hidrólisis, se tiñen y finalmente se aplastan entre el portaobjetos y el cubreobjetos para dispersarlos [25]. Por otro lado, el *spreading* consiste en crear una suspensión celular que luego se extiende sobre un cubreobjetos creando una película delgada, posteriormente la muestra se fija, se deshidrata y se tiñe con el método del aceto-carmín [26]. Finalmente, en el *dropping*, también conocido como *splash*, se crea una suspensión con los núcleos de las células, que más adelante se deja caer a cierta altura sobre un portaobjetos inclinado, lo que provoca el rompimiento de la membrana nuclear y, a su vez, la extensión de los cromosomas [27]

Se sabe que cada especie vegetal contiene cromosomas en distinta cantidad y de tamaños variables, por lo que los protocolos de obtención de material genético suelen ser para una especie o género en particular. Como los individuos de la familia *Agavaceae* son diploides ($2n=60$) y presentan un cariotipo de 5 cromosomas grandes y 25 pequeños [28], se decidió utilizar un método mejorado, el *steamdrop*, para hacer el extendido cromosomal que permita el análisis del material genético.

Steam drop

En este método se combina la técnica de *dropping* con la aplicación de vapor al momento de la formación del menisco sobre las células durante la evaporación del fijador [24]. La adición de este procedimiento extra permite que el vapor efectúe la hidrólisis del citoplasma acelerando la dispersión de cromosomas [23].

El método consiste en recolectar raíces y colocarlas en solución acuosa de α -bromo naftaleno, que detiene a las células en crecimiento en la metafase de la mitosis [29], momento en el cual el material genético está condensada en cromosomas [30]. Posteriormente se prepara la suspensión celular, se gotea sobre un portaobjetos con ácido acético, se expone al vapor y se añade nuevamente ácido acético. Esta segunda adición de ácido acético completa la digestión del citoplasma y permite una extensión cromosomal adicional antes de su inmovilización [24]. El desarrollo de esta técnica permitirá obtener una laminilla con el material genético de las plantas de agave con las características necesarias para su análisis.

Para los análisis citogenéticos pueden utilizarse distintas tinciones para dar mayor contraste al material genético y permitir su visualización, por ejemplo: acridina naranja, azul de anilina, 4',6-diamindio-2-fenilindol (DAPI), y aceto-orceína, entre otros [31]. La acridina naranja es un fluorocromo que tiñe de manera selectiva ácidos nucleicos, interactúa con el ADN por intercalación y con el ARN por atracción electrostática [32]. Asimismo, el azul de anilina es un tinte ácido que tiene gran afinidad por las histonas ricas en lisina en la cromatina relajada dentro del núcleo [33]. Las tinciones utilizadas en el presente proyecto fueron con aceto orceína y DAPI.

Aceto-orceína

La orceína es un colorante perteneciente al grupo de la oxazina. La aceto-orceína se prepara como solución estándar con concentraciones de 45% ácido acético y 1% orceína [34]. La preparación tiñe la heterocromatina de color rosa/morado, y para realizar la tinción, se añaden un par de gotas del colorante a las laminillas preparadas con el método *steamdrop* y se coloca un cubreobjetos para protegerlas, finalmente se observan en el microscopio.

DAPI

El 4',6-diamindio-2-fenilindol, abreviado como DAPI, es una molécula policationica que se une fuertemente a las regiones del ADN nuclear ricas en adenosina-timina a través de enlaces electrostáticos [35]. Los complejos ADN-DAPI formados emiten una fuerte fluorescencia blanca al ser excitados con luz ultravioleta [36], esto debido a la inhibición de la rotación interna de su estructura molecular [35]. Se utilizó esta tinción debido a su disponibilidad en el laboratorio y por su facilidad de uso.

Para analizar la fertilidad de una planta es necesario examinar la viabilidad del polen, ya que esta es fundamental para el proceso de reproducción [37]. Para llevar a cabo este análisis, se tiñen los granos de polen, para lo cual existen dos métodos ampliamente utilizados; la tinción con yodo y la tinción con azul de lactofenol.

La tinción con yodo se basa en la coloración del almidón presente en los granos de polen, los cuales si son viables se tiñen de azul oscuro, esta técnica tiene la ventaja de que es fácil y rápida [38]. No obstante, este método ha sido criticado ya que la cantidad de almidón en el grano no es el único factor limitante de la germinación del tubo polínico [38], por este motivo se optó por utilizar el método con azul de lactofenol.

Tinción de polen con azul de lactofenol

El uso de la tinción azul de lactofenol es una manera útil de distinguir los granos de polen fértiles, pues su citoplasma absorbe fácilmente el colorante, mientras que los estériles no lo

hacen [39]. Para este proceso, los granos de polen se tiñen directamente en el cubreobjetos y usando el estereoscopio se hace un conteo, tanto de los granos viables como de los no viables.

Para completar el análisis de la fertilidad de la planta, se determina el porcentaje de germinación de los granos de polen, pues tanto este evento como el crecimiento del tubo polínico son esenciales en las fases reproductivas de las plantas [40]. Para llevar a cabo la germinación del polen y poder valorarla es necesario utilizar un medio de cultivo con los componentes básicos para este procedimiento: sacarosa, ácido bórico y calcio [41], en concentraciones variables según el experimento. La sacarosa sirve como nutriente principal para la germinación y formación del tubo polínico, mientras que tanto el ácido bórico como los iones de calcio han demostrado ser esenciales para la germinación y el crecimiento del tubo polínico [42] [43]. Las condiciones de incubación son variadas según la especie que se quiera analizar.

Para la micropropagación de agaves existen distintas metodologías, el órgano a generar dependerá del material vegetal que se utilice: semillas o explantes (hojas o meristemos), y el tratamiento que se les dé. De manera general, para la micropropagación de agaves, distintos autores usan medio de crecimiento con sales MS (Murashig y Skoog) suplementado con vitaminas L2 y, en algunos casos, modificando las concentraciones de amonio [7]. Un regulador de crecimiento utilizado normalmente para organogénesis o embriogénesis somática es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones desde 0.-9.05 μ M. No obstante, se ha reportado que hay formación de brote directa en caso de que se use junto con citoquininas, como 6-bencilaminopurina (BA) o citocin kinetina (KIN) [7].

La Tabla 1 muestra el plan de trabajo programado para el presente PAP. En esta se especifican los recursos humanos, materiales y tecnológicos necesarios para completar cada actividad. Asimismo, se detalla el tiempo requerido para cada actividad y la semana en la que se planea sea realizada.

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
Revisión bibliográfica		3																
Reuniones de trabajo con Dr, Rodríguez	DM	1																
Riego de plantas	I PA	1																
Preparación de medio de cultivo para micropropagación	AC	1																
Micropropagación de <i>A. chazaroi</i>	CF CI	1																
Revisión de avance de cultivo de <i>A. chazaroi</i>	CI PA	1																
Recolección y pretratamiento de raíces	I	2																
Fijación y tratamiento enzimático de raíces	ES IB	2																
Preparación de suspensión celular	MC	1																
Preparación y análisis de laminillas de extensión cromosomal	CE BM MS IP	1																
Análisis de meiosis en <i>A. geminiflora</i>	MS IP PA	1																
Análisis de viabilidad de polen de <i>A. geminiflora</i>	ES PA	1																
Preparación de medio para germinación de polen	CF	1																
Germinación y análisis de polen de <i>A. geminiflora</i>	PA ES	3																
Análisis citogenético de <i>A. attenuata</i>	MS	1																
Preparación de medio de cultivo para enraizamiento	AC	1																
Experimento de enraizamiento <i>in vitro</i> de agave	CE IB PA	2																
Revisión RPAP por asesor		1																
Revisión RPAP por director del PAP	DM	1																
Presentación oral del PAP		1																

En la Tabla 2 se exponen los significados de las abreviaturas utilizadas en el cronograma para indicar los recursos necesarios en cada actividad.

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

Recursos utilizados	
Abreviatura	Significado
DM	Asesoría Dr. Manuel Rodríguez (director del PAP)
PA	Plantas de agave (<i>A. chazaroi</i> , <i>A. geminiflora</i> , <i>A. attenuata</i> , <i>A. guiengola</i> y <i>A. applanata</i>)
AC	Autoclave
CE	Campana de extracción
CF	Campana de flujo laminar
BM	Baño maría
ES	Estereoscopio
MS	Microscopio
MC	Microcentrífuga
IP	Image-Pro AMS Software
IB	Incubadora
CI	Cuarto de incubación
I	Invernadero

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Como se resalta previamente, es fundamental comprender la diversidad genética del agave con la finalidad de desarrollar estrategias que permitan conservar su genoma, y se desarrollen programas de mejoramiento. Para poder realizar los análisis citogenéticos, es necesario obtener extendidos cromosomales de calidad, es decir, sin citoplasma ni cromosomas traslapados [23]. Como ya se mencionó anteriormente, en el presente proyecto se utilizó la técnica de *steamdrop*, usando como referencia lo indicado por Rodríguez-Domínguez *et al.* [23].

Obtención de material vegetal

Se recolectaron las puntas de las raíces de aproximadamente 0.5cm de *A. attenuata* y *A. guiengola* (Figura 1) de la colección de agaves del CIATEJ. Las puntas de raíz fueron colocadas en una solución acuosa de α -bromonaftaleno en concentración 1:1000 y se conservaron a 4°C por 48 horas. Se usó α -bromonaftaleno pues es un agente antimitótico que tiene la capacidad de detener a las células en la metafase, además de condensar los cromosomas durante la mitosis [44]. Las puntas de las raíces son el tejido vegetal ideal por distintas razones: son fáciles de manipular, se puede estudiar el efecto inmediato de distintas

sustancias, son fáciles de obtener, están disponibles todo el año y hay gran cantidad de células en división [45].

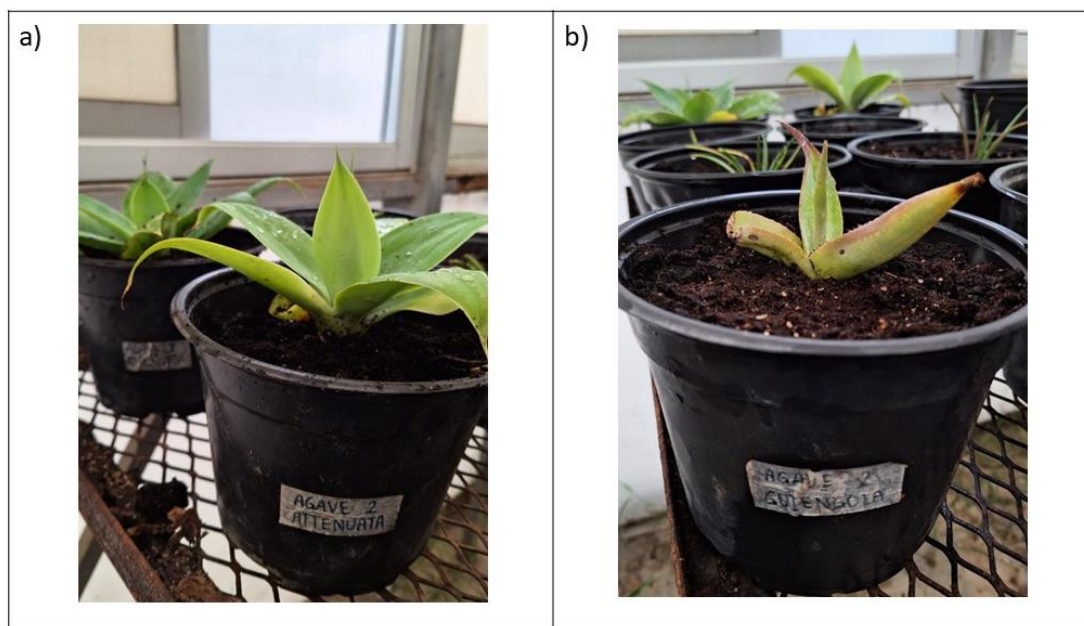


Figura 1. a) *A. attenuata* y b) *A. guiengola*

Pretratamiento, fijación y tratamiento enzimático

Una vez transcurridas las 48h antes mencionadas, se retiró la solución de α -bromonaftaleno de las muestras de raíz y se les añadió una solución fijadora de metanol:ácido acético en concentración 3:1, las muestras fueron conservadas a 4°C por 24 horas. La solución fijadora tiene esta función pues el metanol, al tener una estructura que semeja la del agua, compite en los tejidos por los enlaces de hidrógeno en proteínas. El metanol sustituye al agua y expone los grupos hidrófobos internos de proteínas, lo que altera su estructura terciaria y su solubilidad en agua [46]. Por otra parte, el ácido acético, a pesar de no tener gran impacto sobre las proteínas, sí actúa sobre los ácidos nucleicos. El ácido acético se considera un agente no coagulativo, y ayuda a prevenir la pérdida de ácidos nucleicos. [47]

Después de 24h, se retiró la solución fijadora de las muestras de puntas de raíz y se añadió agua destilada para hacer un enjuague durante 10 minutos. Posteriormente, utilizando el estereoscopio Leica StereoZoom SZ-4 y un bisturí, se diseccionaron los meristemos,

identificándolos como la parte opaca o lechosa en la punta de cada raíz. Los meristemos se colocaron en microtubos con una solución 10mM de buffer citrato a pH 4.5, y se dejaron reposar durante 10 minutos.

Pasado el tiempo de reposo, se retiró el buffer de las muestras y se añadió una mezcla enzimática que contenía 0.2%(p/v) de pectinasa Y23, 0.2% (p/v) de celulasa RS y 0.2% (p/v) de citohelicasa en una solución 10mM de buffer citrato a pH 4.5. Debido a que las raíces eran de un diámetro pequeño, las muestras se dejaron incubar por 2.5 horas a 37°C en una incubadora húmeda. La pectinasa Y23 es una enzima de maceración altamente purificada proveniente de *Apergillus japonicus* y contiene dos pectinasas [48]. Las enzimas utilizadas: pectinasa Y23 y la celulasa RS, degradan a la pectina y a la celulosa, sustancias presentes en la pared celular de las células vegetales [49].

Preparación de suspensión celular

Después de la incubación, se utilizó el agitador Vórtex Genie 2 para formar la suspensión celular y se retiraron, con pinzas, los fragmentos no digeridos de los meristemos. Se añadió agua destilada y se centrifugaron las muestras a 10,000 rpm por 45 segundos. Se desechó el sobrenadante, el botón formado se resuspendió en metanol y la muestra se centrifugó nuevamente a 11,000 rpm por 30 segundos. Finalmente, el sobrenadante se descartó por inversión, y el pellet se resuspendió en metanol, la suspensión celular se almacenó a -4°C hasta su uso.

Preparación de laminillas

El procedimiento se llevó a cabo dentro de la campana de extracción, donde para comenzar se encendió el baño maría a 55°C y se colocaron los portaobjetos rotulados dentro de una copa koplín con ácido acético puro. Posteriormente se colocaron 7µL de la muestra resuspendida en el portaobjetos inclinado en un ángulo de aproximadamente 45°. Inmediatamente después, se añadieron 2 gotas de ácido acético puro y se colocó la laminilla boca abajo sobre el vapor del baño maría durante 6 segundos. Se añadió una gota más de ácido acético y se dejaron secar las laminillas con el flujo de aire.

El ácido acético funciona como buen fijador no sólo por su capacidad de estabilizar los ácidos nucleicos, sino que, además, el tiempo que requiere para realizarlo es muy corto por la rápida penetración que este tiene en los tejidos [47]. La combinación metanol:ácido acético permite preservar la estructura y morfología cromosómica con una mayor calidad que con otras mezclas [50], además ha mostrado ser más eficiente en la lisis celular pues dispersa los fragmentos de citoplasma y separa los cromosomas [50]. Asimismo, en la técnica de *steamdrop*, el vapor provee la humedad y temperatura necesaria para la evaporación rápida de la solución fijadora, lo que evita el alargamiento de los cromosomas y evita su sobredispersión [50].

Análisis de laminillas

Para evaluar la calidad de los extendidos cromosomales realizados, se añadieron 2 gotas de aceto-orceína a cada laminilla, y se colocó un cubreobjetos para protegerlas. Las laminillas teñidas se examinaron en el microscopio Leica DM5500B-CS espectral confocal, se observó que los cromosomas se tiñeron de rojo por el principio del colorante. Según la cantidad de células visualizadas y la distribución de los cromosomas, se hicieron pequeñas modificaciones al método de extensión. Aunque el mecanismo de la técnica de tinción no está completamente entendido, ya que la aceto orceína es un conjunto de fenazones [51], se cree que esta puede interactuar con grupos cargados negativamente en un ambiente ácido o posiblemente, interactúe de manera hidrofóbica con la cromatina intercalándose en las regiones heterocromáticas del material genético [52].

Se prepararon más laminillas con muestra para obtener mejores extendidos cromosomales. En la elaboración de muestras de *A. attenuata* no hubo cambios en la metodología, a diferencia de las de *A. guiengola*, las cuales se prepararon en un menor ángulo de inclinación, 30° aproximadamente, y se dejaron 7 segundos sobre el vapor. A estas laminillas no se les añadió aceto-orceína pues las mejores serían tratadas más adelante con el agente de tinción fluorescente DAPI.

Las laminillas preparadas se observaron en el microscopio Leica DM5500B-CS espectral confocal y, utilizando el programa Stage-Pro, se registró la localización de las células cuyo material genético fuera útil para realizar el análisis citogenético. Las características de selección de células para su marcaje fueron que los cromosomas se visualizaran condensados, nítidos, separados uno de otro y que no hubiera otros componentes que dificultaran su observación

Marcaje y análisis con DAPI

Para realizar el marcaje con DAPI, sólo se utilizaron las laminillas de extensión cromosomal de *A. attenuata* sin teñir preparadas anteriormente, pues las de *A. guineensis* no contaban con material genético suficiente. A cada laminilla se le añadieron 50µl del colorante DAPI, se les colocó un cubreobjetos y se dejaron reposar 5 minutos en oscuridad. Posteriormente se llevaron al cuarto de análisis, donde se utilizó un sistema de microscopio confocal vertical automático Leica DM 5500 con el microscopio fluorescente Leica CTR 550. Con este sistema, se fotografiaron las células que mostraran una metafase de mejor calidad (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), es decir, que mostraran cromosomas condensados y separados, asimismo se contabilizaron y numeraron en la mejor fotografía obtenida (Figura 3).

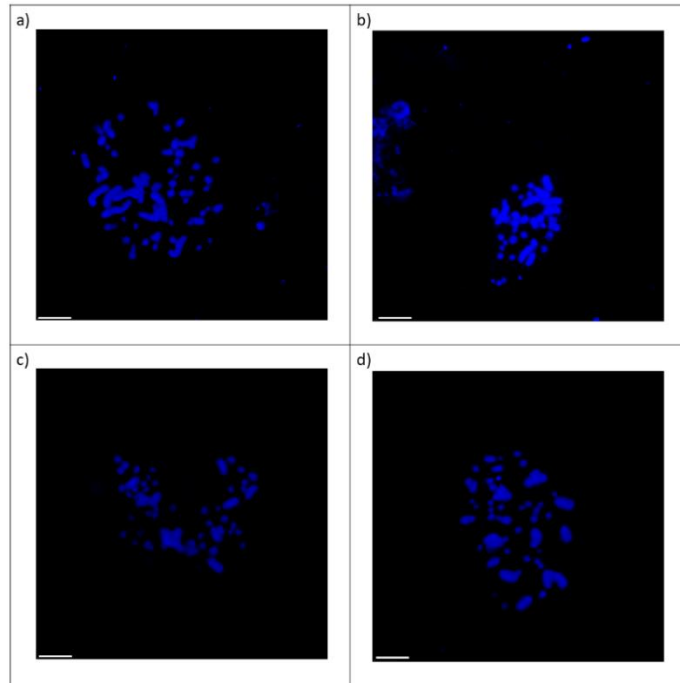


Figura 2. Cromosomas de *A. attenuata* teñidos con DAPI. Barra de escala 10µm

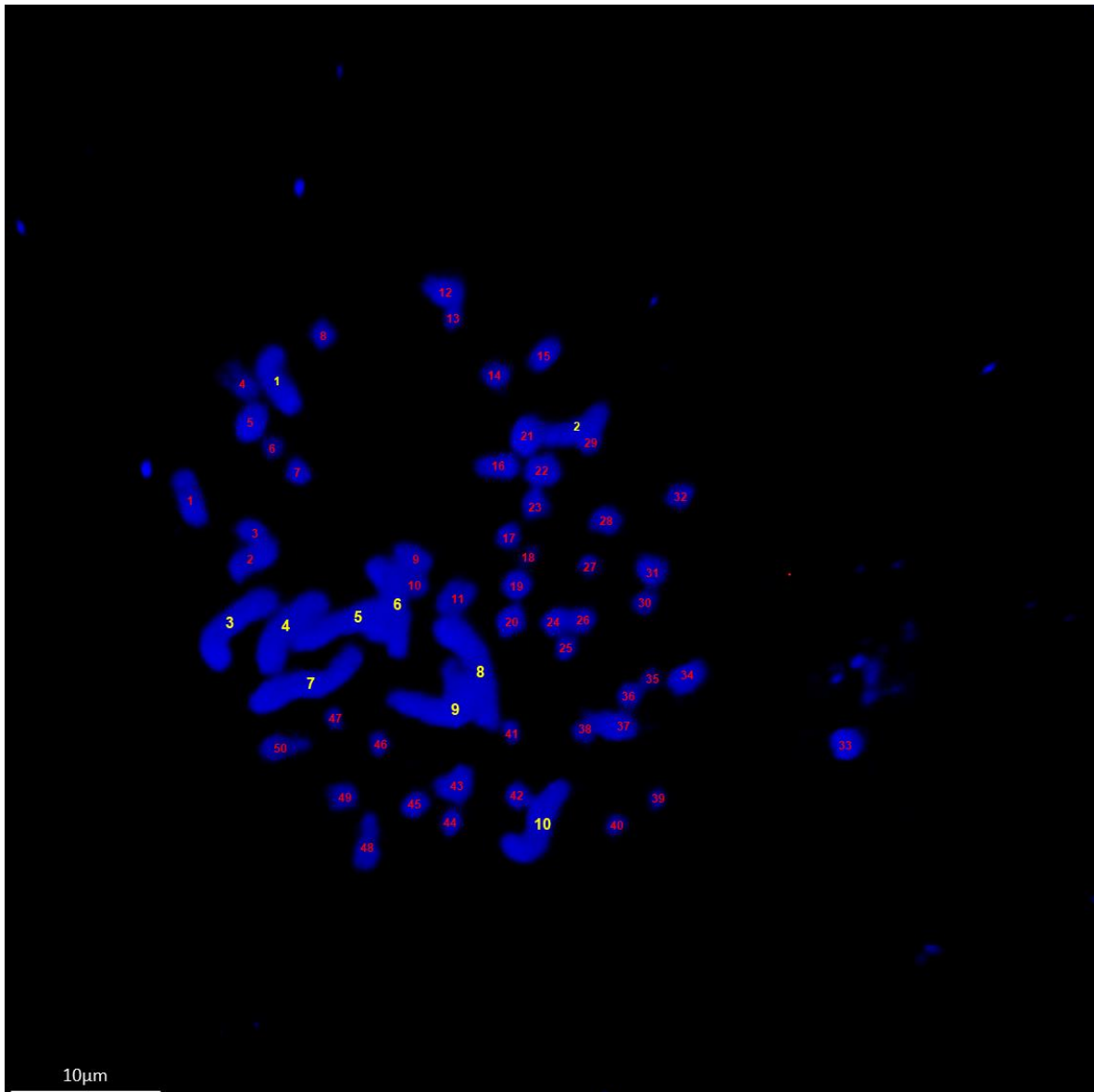


Figura 3. Cromosomas numerados de *A. attenuata* teñidos con DAPI (Figura 2, a). Cromosomas grandes en amarillo, cromosomas pequeños en rojo.

El 4',6-diamindio-2-fenilindol, o DAPI, es un fluoróforo altamente utilizado para tinciones cromosomales ya que tiene un rendimiento cuántico alto al unirse al ADN. Este es un parámetro que muestra la eficiencia de emisión de un fluoróforo y su equivalente al radio entre los fotones emitidos y los fotones absorbidos [53]. El DAPI se caracteriza por formar complejos fluorescentes al unirse al surco menor de las regiones AT del ADN [54]. La tinción es de color azul fluorescente y normalmente es excitado por luz ultravioleta (UV) a 358nm, emitiendo al máximo a 461nm [55].

Análisis de meiosis en células germinales de polen

Se recolectaron botones florales de *A. geminiflora* de la colección de agaváceas del CIATEJ (Figura 4, Figura 4, Figura 5a). Con un vernier se midió el largo del botón (5b) y con unas pinzas delgadas se separaron los tépalos y se sacó una antera, la cual también fue medida. La antera se colocó sobre un portaobjetos limpio y rotulado, se añadió una gota de aceto-orceína y se trituró con ayuda de un bisturí. Se retiraron los fragmentos residuales más grandes, se le colocó un cubreobjetos y la laminilla se visualizó en el microscopio Leica DM5500B-CS espectral confocal.



Figura 4. *A. geminiflora* de la colección de agaváceas del CIATEJ

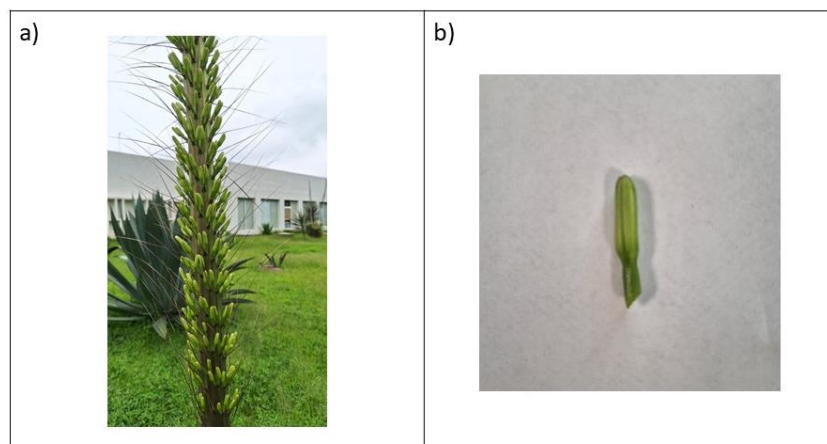


Figura 5. *A. geminiflora* de la colección de agaváceas del CIATEJ
a) Botón floral, b) Tallo con botones

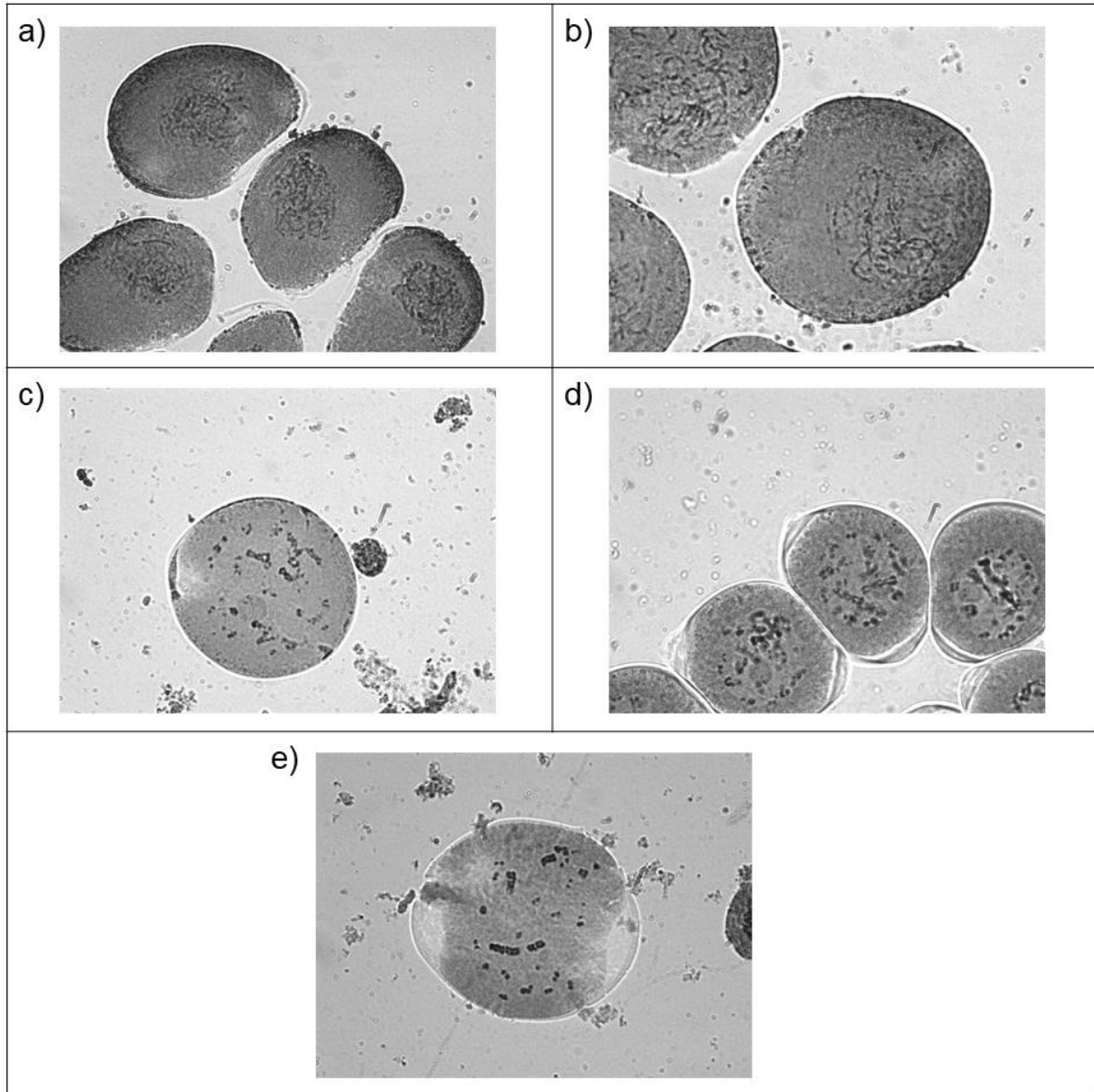
En la laminilla se observaron las células germinales en las distintas fases de la meiosis I y de la meiosis II, y se fotografió cada una de las que se fueron identificando. Como cada antera presentaba un mismo grado de maduración, se prepararon más laminillas utilizando distintos botones florales según la fase de la meiosis que se quisiera ver. Es decir, si se quería observar una fase temprana se utilizaban botones de menor tamaño, mientras que, si se querían visualizar células en fases más avanzadas, se trabajaba con botones más grandes.

La meiosis I es la primera parte de la división celular, cuyo objetivo es separar los pares homólogos de los cromosomas. Esta se divide en cuatro fases: Profase I, Metafase I, Anafase I y Telofase I. En la Profase I sucede el entrecruzamiento donde los cromosomas homólogos forman pares e intercambian fragmentos, en la Metafase I los pares homólogos se alinean a la placa ecuatorial para que, en la Anafase I, los homólogos se separen hacia extremos opuestos de la célula mientras que las cromátidas hermanas se mantienen juntas [56]. Finalmente, en la Telofase I los cromosomas llegan a los polos opuestos de la célula y se descondensan [57].

Por otro lado, la meiosis II es la continuación de la división celular, donde las células son haploides, es decir, tienen un cromosoma de cada par homólogo [56]. Aquí el objetivo es separar las cromátides hermanas; tiene las mismas fases que la Meiosis I, pero diferenciadas con un II. En la Profase II los cromosomas se condensan, para poder alinearse en la Metafase II, las cromátides hermanas se separan en los extremos opuestos de las células en la Anafase II y por último los cromosomas se descondensan en la Telofase II [57].

En la Figura 6 se muestran las fotografías de las células germinales en las distintas etapas de la profase I. La Profase I es considerada la fase más larga y compleja de la meiosis, pues es donde sucede el entrecruzamiento y hay intercambio de fragmentos de material genético. Esta fase se divide en 5 etapas: Leptoteno, Cigoteno, Paquitenio, Diploteno y Diacinesis. En el Leptoteno los cromosomas homólogos se condensan, durante el Cigoteno, los cromosomas homólogos se aparean y realizan la sinapsis, es decir, se unen. En la siguiente etapa, el Paquitenio, los cromosomas se acortan, forman cromosomas bivalentes y ocurre el entrecruzamiento, lo que provoca que las cromátidas hermanas dejen de ser idénticas. A lo

largo del diploteno, los cromosomas homólogos comienzan a separarse, quedando unidos sólo por los quiasmas, y para finalizar, en la diacinesis se terminan de condensar los cromosomas u se distribuyen en el núcleo [58].



**Figura 6. Células germinales de *A. geminiflora* en profase I, vistas en el microscopio con aumento 100X.
a) Leptoteno, b) Cigoteno, c) Paquiteno, d) Diploteno, y e) Diacinesis**

En la Figura 7 se muestran las fotografías de las células germinales en las distintas fases de la meiosis I, meiosis II y el polen inmaduro.

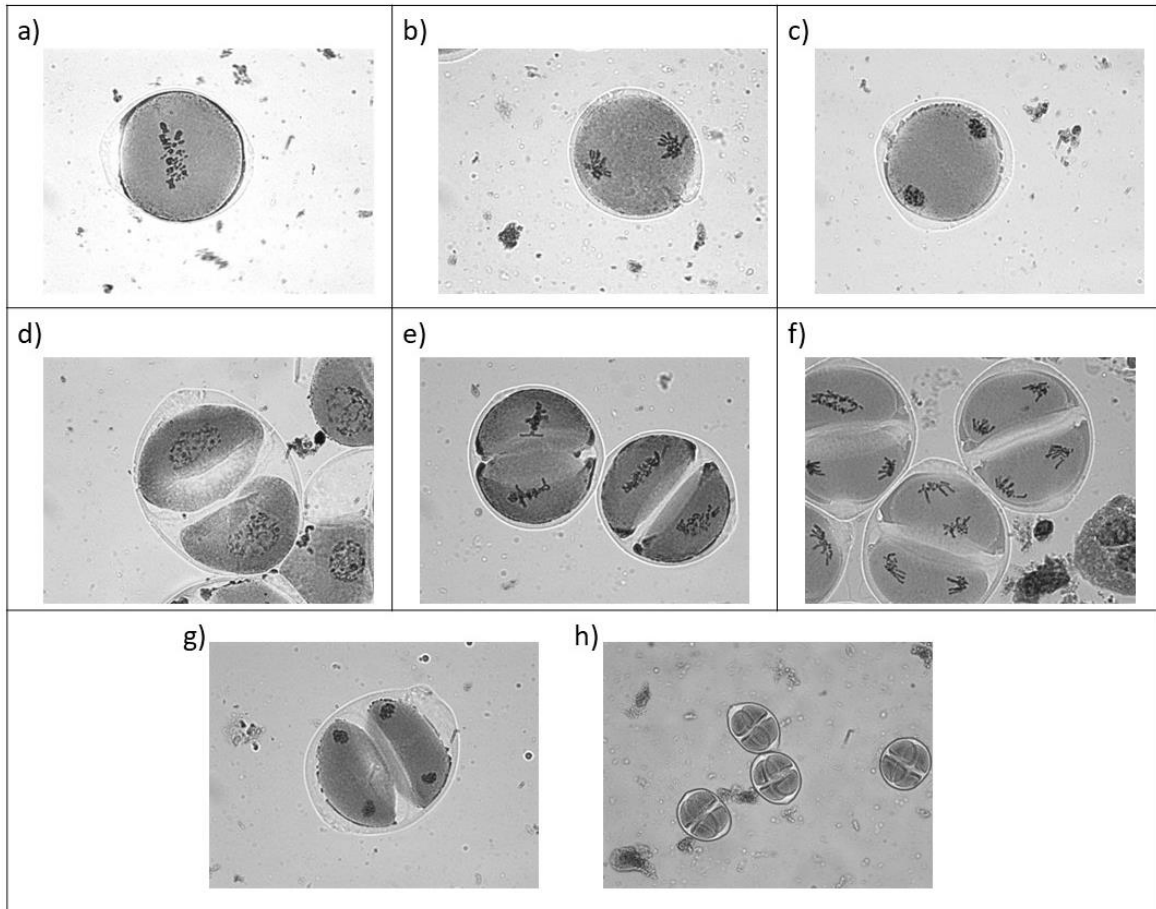


Figura 7. Células germinales de *A. geminiflora* en Meiosis I y Meiosis II, vistas en el microscopio con aumento 100X. a) Metafase I, b) Anafase I, c) Telofase I, d) Profase I, e) Metafase II, f) Anafase II, g) Telofase II, y h) Tétrada de polen (40X)

Viabilidad del polen

Con el fin de evaluar la viabilidad del polen, se realizaron dos pruebas distintas; tinción y germinación. Para esto se recolectaron las flores del mismo individuo de *A. geminiflora* (Figura 8) utilizado anteriormente. Para la tinción, se utilizó el mismo método que en Rodríguez-Domínguez [50] y se transfirieron los granos de polen a un portaobjetos limpio usando una de las anteras de la flor (Figura 9, a) como aplicador. Posteriormente se añadieron dos gotas de azul de lactofenol al 1%, se colocó el cubreobjetos y se dejó reposar por 5 minutos.

Pasado el tiempo de reposo, se observó la laminilla en el microscopio de contraste de fases VELAB VE-B10. Se realizó un conteo de 100 granos de polen, diferenciando entre viables y no viables. Los granos viables se distinguían por presentar una coloración azul intensa, mientras que los no viables se observaban con una mancha o totalmente blancos (Figura 9,b). El proceso se repitió 6 veces, utilizando la antera de una flor distinta, con lo que se obtuvo un porcentaje de viabilidad del 95%.



Figura 8. *A. geminiflora*, floración.

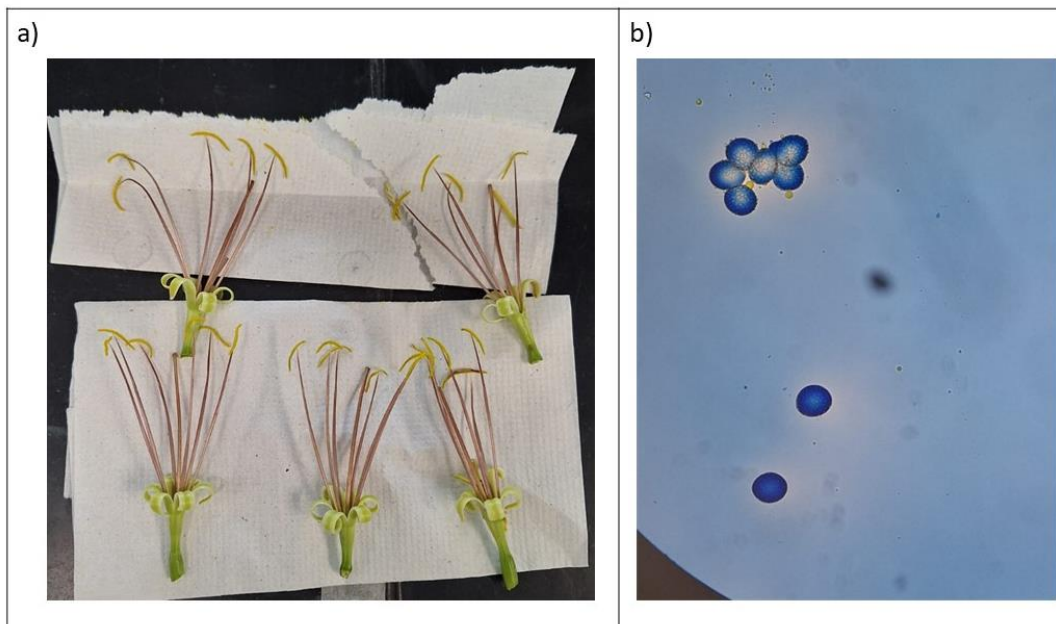


Figura 9. *A. geminiflora*. a) Flores, b) Granos de polen vistos en el estereoscopio

Para la siguiente prueba se preparó medio de cultivo especial para germinación de polen [50], con 102g/L de sacarosa, 20mg/L de ácido bórico, 288mg/L de nitrato de calcio y 5g/L de agar, el cual se esterilizó y vació en cajas Petri. De igual manera que en el experimento de viabilidad, el polen se obtuvo de *A. gemiflora* y se dispersó sobre la superficie del medio utilizando la antera como aplicador. Las cajas Petri se envolvieron con papel aluminio y se dejaron incubando en un lugar oscuro. Después de tres días, se utilizó el microscopio estereoscópico Leica EZ4-HD para examinar las cajas, y se contabilizaron los granos de polen observados (Figura 10), distinguiendo aquellos que mostraban la aparición de un tubo polínico de los que no. Se estableció un límite de conteo de 100 granos por caja, obteniendo un promedio de germinación de 44.6%.

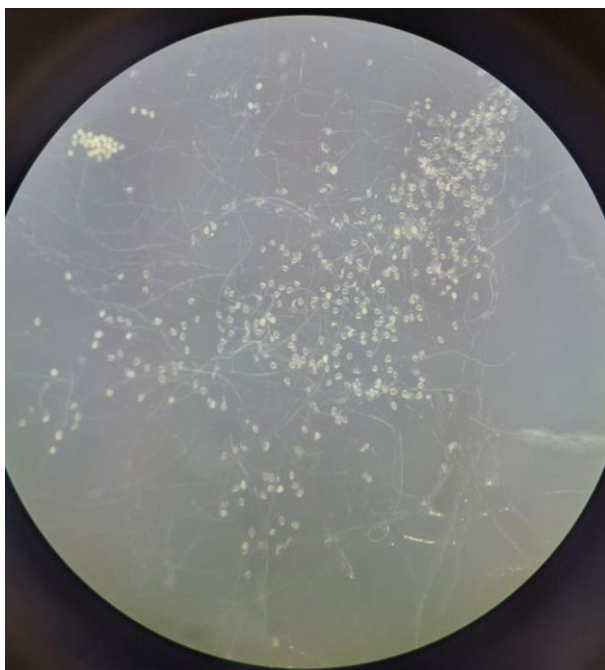


Figura 10. Granos de polen de *A. gemiflora* germinados, vistos en estereoscopio

Micropropagación por germinación

Para la micropropagación de *A. chazaroi*, se preparó medio de cultivo con sales MS a una concentración 1/10, el cual se colocó en botes de medio litro estériles. Las semillas fueron desinfectadas de acuerdo a la siguiente metodología: primero se colocaron en agua con detergente para trastes comercial, se agitaron por 5 minutos y se enjuagaron con agua común. Posteriormente se pasaron a un tubo falcon, se les añadió alcohol al 70% y se agitaron por

un minuto. Se descartó el etanol cuidadosamente, se añadió una solución 50:50 de agua con cloro comercial al 3% y se removieron durante 10 minutos.

Finalmente, se desechó la solución de cloro y se finalizó con 3 enjuagues con agua destilada durante 5 minutos cada uno. Al terminar los enjuagues se pasaron las semillas a los botes con medio, se sellaron con parafilm y se dejaron en el cuarto de incubación. No se muestran los resultados de este experimento ya que la germinación no fue exitosa, pues después de 3 semanas todavía no había señales de crecimiento.

Micropropagación por hijuelos

La micropropagación de *A. attenuata* se decidió realizar mediante hijuelos presentes en la base de los individuos de la colección de agaváceas del CIATEJ. Para esto se preparó y esterilizó medio de cultivo con 100ml/L de sales MS 10X, 10ml/L de 6-bencilaminopurina (BA), 25µL/L de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 30g/L de sacarosa y 8g/L de agar, ajustando el pH a 5.8 ± 0.2 . La bencilaminopurina es una citoquinina que promueve la división celular, lo que induce a la formación de órganos [59], mientras que el 2,4-D a bajas concentraciones se comporta como una auxina inductora de formación de callo [60].

Los hijuelos fueron preparados quitándoles todas las hojas con una cuchilla o cutter, se les retiró el exceso de tierra con agua común y se lavaron con agua y jabón potásico. Para su desinfección se comenzó con un lavado por 1 minuto en una solución de 60mL de agua destilada estéril con 25mL de etanol al 96%. Se continuó con un lavado en una solución 50:50 de agua con cloro comercial (3%), la cual duró 10 minutos con agitación constante. Se hicieron 2 enjuagues de 5 minutos con agua destilada, y se finalizó con un lavado con agua destilada y 4ml de aceite de cítricos.

Los hijuelos o explantes desinfectados se colocaron en los botes con medio de cultivo y se llevaron al cuarto de incubación. A pesar de los lavados, el experimento no tuvo resultados exitosos pues los explantes presentaron contaminación por hongo a los 5 días posteriores a su establecimiento.

Enraizamiento

Para trabajar con *A. applanata*, se decidió utilizar la técnica de enraizamiento, pues en otra línea de investigación ya se había logrado realizar un protocolo exitoso de micropropagación. Se utilizaron 3 medios de cultivo distintos: medio de control, medio suplementado con el regulador de crecimiento AIB (ácido indol-3-butírico) y medio con carbón activado. Los tres medios fueron preparados y esterilizados con 8g/L de agar, 100ml/L de concentrado MS 10X, 30g/L de sacarosa y un pH ajustado a 5.8 ± 0.2 . Al medio suplementado con AIB se le añadió 1mg/L de la hormona al mismo tiempo que se le añadió la sacarosa, mientras que al medio con carbón activado se le añadieron 3g/L del mismo junto con el agar.

Para establecer los explantes de *A. applanata*, se utilizaron los individuos obtenidos por micropropagación, los cuales fueron extraídos en condiciones estériles. Al momento de la extracción, se separaron las muestras utilizando pinzas y bisturí desinfectados siguiendo la ramificación de sus hojas, y se pasaron a los medios de cultivo, colocando 5 especímenes por recipiente. Al finalizar, se sellaron con parafilm y se colocaron en el cuarto de incubación. Una semana después, se llevó a cabo el conteo de raíces formadas por cada individuo establecido. Los cultivos con medio control y medio AIB se analizaron fuera de la campana de flujo laminar ya que su opacidad de estos permitía visualizar la cantidad de raíces de cada plántula. Por otro lado, los cultivos con medio con carbón se examinaron en la campana de flujo laminar pues se tenía que retirar cada plántula del medio para poder observar su desarrollo. El proceso se repitió una semana después, y los resultados fueron analizados mediante un ANOVA One Way, además se realizó una prueba de Tukey y de Fisher para comparar las diferencias entre tratamientos.

Para el análisis estadístico, se consideraron los tratamientos control, AIB y carbón como tratamientos 1, 2 y 3, respectivamente. En la Tabla 3, se observa que el tratamiento 2 fue el que tuvo una diferencia altamente significativa, lo que se confirma tanto en la prueba de Tukey (Tabla 4) y en la de Fisher (Tabla 5), así como en el gráfico de intervalos de promedios contra tratamiento (Figura 11), pues el valor del tratamiento dos es mucho más alto y no se alinea a los de los tratamientos 1 y 3.

Tabla 3. ANOVA

Source	DF	Seq SS	Contribution	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tratamiento	2	79.34	42.91%	79.34	39.670	12.40	0.000
Error	33	105.57	57.09%	105.57	3.199		
Total	35	184.91	100.00%				

Tabla 4. Prueba de Tukey

Tratamiento	N	Mean	Grouping
2	12	6.033	A
3	12	3.133	B
1	12	2.683	B

Tabla 5. Prueba de Fisher

Tratamiento	N	Mean	Grouping
2	12	6.033	A
3	12	3.133	B
1	12	2.683	B

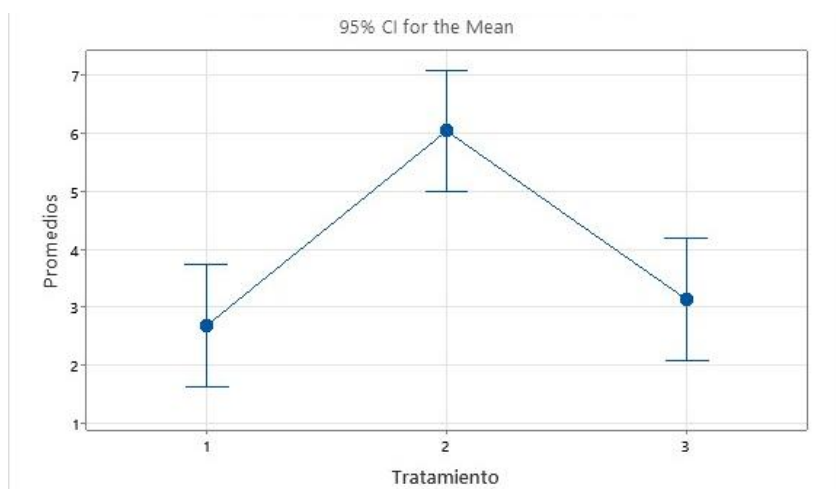


Figura 11. Intervalos de promedios contra tratamiento

En conclusión, el mejor medio para enraizamiento es aquel que fue suplementado con AIB, pues es un regulador de crecimiento conocido por promover y acelerar la formación de raíces en plantas [61], actúa penetrando el tejido vegetal e incrementa la acumulación de auxinas, estimulando la división celular [62]. Esto era de esperarse, pues el medio control no está

suplementado con ninguna fitohormona y los efectos del carbón activado iban enfocados al oscurecimiento del medio, lo que simula las condiciones de la planta en la naturaleza [63].

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Conteo cromosomal de A. attenuata

Las fotografías de las extensiones cromosomales de *A. attenuata* teñidas con DAPI, permitieron el conteo de los cromosomas presentes en estas células. La cantidad cromosomal de *A. attenuata* no había sido especificada, pues se consideraba que esta especie tenía entre 45 a 62 cromosomas y era diploide [64].

En la Figura 3 se observa la clasificación por tamaño y el conteo de cromosomas, dando como resultado 10 cromosomas grandes y 50 cromosomas pequeños, con lo que se puede afirmar que *A. attenuata* cuenta con 60 cromosomas y es diploide. Estos datos son respaldados por lo reportado en otras especies ya que el género *Agave* se caracteriza por su cariotipo bimodal [65] y un número cromosómico diploide de $2n=60$, el cual se compone de cinco pares de cromosomas grandes y veinticinco pares de cromosomas pequeños [66].

Se espera que, en una etapa posterior del presente proyecto, se realice la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Esta permite analizar directamente la posición de una secuencia de genes al marcarlas en los cromosomas para después detectarlas con un microscopio de fluorescencia [67]. El uso de esta técnica con células en metafase [68], facilita el estudio de la organización y evolución de los cromosomas y en caso de hacer un mapeo de ADN ribosomal, es posible relacionar los pares de cromosomas [67] por similitud de bandeo.

Análisis de meiosis en A. geminiflora

La división meiótica es un proceso clave en la reproducción sexual de las especies, incluye dos divisiones nucleares sucesivas, la primera es reduccional y la segunda es ecuacional, el fallo en alguna de ellas puede provocar errores cromosómicos que afecten la viabilidad de los gametos [69]. Se han reportado irregularidades tanto en anafase I como en anafase II de células germinales de polen de *A. tequilana*, dando como resultado divisiones meióticas

aberrantes, asimismo se han encontrado malformaciones en los cromosomas de *A. stricta* [69], fallas en la citocinesis y la formación de un huso anormal en *A. angustifolia* [70].

En la Figura 6 se muestran las cinco fases de la profase I mientras que en la Figura 7 se muestran las distintas etapas de la meiosis I y la meiosis II. En las células analizadas no se aprecia la formación de puentes ni cromosomas retrasado, los cuales son representaciones de comportamientos erráticos en el movimiento de cromosomas [71]. Esta observación se respalda con el porcentaje de viabilidad obtenido de las células germinales de polen de *A. geminiflora* (Figura 9), que fue de 95%. Este es un valor relativamente alto comparado con otras especies, ya que, utilizando una técnica similar a la presente, se obtuvo una viabilidad de ~58% para *A. tequilana* y ~43.6% para *A. fourcroydes* [72], además de que se considera que el género *Agave spp.* tiene una considerable tasa de esterilidad en su polen [73].

Al realizar el experimento de germinación (Figura 10), se observó una disminución considerable de la fertilidad del polen, pues tan solo 44.6% de los granos desarrollaron tubo polínico. Este valor es cercano al de los análisis de polen de otras especies utilizando la misma técnica, pues para *A. tequilana* se obtuvo un 36% mientras que para *A. americana* se obtuvo un 79.5% [72]. Al analizar esto, se puede afirmar que existe la posibilidad de que sí haya cambios estructurales en los cromosomas durante la meiosis, como inversiones heterocigóticas, intercambio de cromátidas, deleciones y duplicaciones [71], pero que estas no hayan sido visualizadas.

Los resultados de este análisis permitieron observar el proceso de meiosis de las células germinales de polen de *A. geminiflora*, sin embargo, los resultados no son concluyentes en relación con el porcentaje de germinación obtenido, por lo que es necesaria más investigación. Se contempla que en una etapa posterior del proyecto se puedan realizar análisis puntuales de cada una de las fases de la meiosis para reconocer errores en caso de que los haya.

Micropropagación por germinación de A. chazaroi

La germinación de semillas de *A. chazaroi* no fue exitosa, pues después de tres semanas posteriores de cultivo no hubo resultados. Esto puede deberse a distintos factores, los cuales se pueden dividir en externos e internos. Los primeros incluyen la humedad, temperatura de la cámara de incubación, gases, respiración y metabolismo de germinación, mientras que en los segundos se incluye la madurez de la semilla tanto desde el punto de vista morfológico como fisiológico, así como su viabilidad [74]. Sería una buena opción que, en ediciones futuras del proyecto, se volviera a intentar la micropropagación con semillas de *A. chazaroi*, pero cambiando variables, como utilizar otro lote de semillas o con un medio de cultivo suplementado.

Micropropagación por hijuelos de A. attenuata

La micropropagación por hijuelos de *A. attenuata* no pudo ser completada con éxito pues los cultivos presentaron contaminación fúngica a los tres días de su establecimiento. Esto pudo deberse a que el proceso de desinfección de los hijuelos no fue suficiente ya que la cantidad de microorganismos presentes en estos es más alta por tener contacto con el suelo o por contaminación cruzada al manipular los tejidos [75].

En [76] se probaron varios protocolos para desinfectar yemas axilares, utilizando como agentes desinfectantes etanol, hipoclorito de sodio y cloruro de mercurio en distintas tanto proporciones como en lapsos de tiempo. En el presente proyecto se concluyó que la mejor metodología fue empleando una solución de etanol al 70% por 1 minuto, siguiéndola por un lavado de 20 minutos con hipoclorito de sodio. Es por esto que se recomienda que en una próxima etapa del proyecto se repita el procedimiento experimentando con distintas duraciones en los tiempos de lavado o utilizando distintas concentraciones de las soluciones desinfectantes.

Enraizamiento de A. applanata

Los resultados del análisis estadístico del experimento de enraizamiento de *A. applanata*, (Tabla 3, Tabla 4, Tabla 5, Figura 11) utilizando tres medios distintos: control, suplementado con AIB y suplementado con carbón activado, fueron concluyentes a que el mejor medio era

el que contenía la fitohormona. Esto concuerda con lo reportado en los cultivos *in vitro* de *A. americana*, donde obtuvieron una frecuencia de enraizamiento más alta en medios de cultivo que contenían ácido indol-3-butírico [77].

Asimismo, se espera que las plantas en este medio de cultivo tengan características superiores a las del resto de los experimentos, pues en [78] se menciona que los especímenes de *A. potatorum* incubados en medio con AIB, desarrollaron plántulas de mayor tamaño, con un diámetro de tallo y área de la sección transversal de las hojas más grandes. Se espera que los resultados obtenidos de este experimento permitan incluir esta información en un protocolo de micropropagación de *A. applanata* y que sea útil para la obtención de material vegetal necesario para análisis posteriores.

1.7. Bibliografía y otros recursos

- [1] Z. a. E.-A. H. García, «Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, AC,» *Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología* , vol. 9, nº 17, pp. 117-129, 2016.
- [2] CIATEJ;, «Biotecnología Vegetal,» CIATEJ, 2023. [En línea]. Available: <https://ciatej.mx/investigacion/biotecnologia-vegetal>. [Último acceso: 30 Agosto 2023].
- [3] J. A. F. L. M. M.-d.-C. S. T. & E. A. Gutiérrez-Urbe, «Pulque,» *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, pp. 543-556, 2017.
- [4] B. Rodríguez-Garay y J. M. Rodríguez-Domínguez, «Micropropagation of Agave Species,» *Plant Cell Culture Protocols*, vol. 1815, pp. 151-159, 2018.
- [5] K. Moreno y M. Monja, «Cultivo in vitro de agaves,» *Ciencia*, vol. 21, nº 1, pp. 76-81, 2021.
- [6] A. García, «Los agaves de México,» *CIENCIAS*, pp. 14-23, 2007.
- [7] E. H.-S. L. & S. J. Bautista-Montes, «Advances in the micropropagation and genetic transformation of Agave species.,» *Plants*, vol. 11, nº 13, p. 1757, 2022.

- [8] A. P. H. J. L. P. M. R. & G. M. P. Mandujano Bueno, « Diversidad genética de maguey (*Agave* spp.) en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato.,» *Revista mexicana de ciencias agrícola*, vol. 9, nº 3, pp. 522-523, 2018.
- [9] CIATEJ, «Código de Conducta del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ, A.C.),» 31 agosto 2021. [En línea]. Available: https://www.ciatej.mx/files/integrity/pdf_5b0704b1b53de.pdf. [Último acceso: 26 septiembre 2023].
- [10] CIATEJ, «Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible,» CIATEJ, 2023. [En línea]. Available: <https://ciatej.mx/el-ciatej/quienes-somos>. [Último acceso: 26 septiembre 2023].
- [11] CIATEJ, «CIATEJ,» 2023. [En línea]. Available: <https://ciatej.mx/>. [Último acceso: 26 septiembre 2023].
- [12] CIATEJ, «Currículum Vitae Dr. José Manuel Rodríguez,» [En línea]. Available: https://ciatej.mx/files/researchers/researcher_5b3a66534280d.pdf. [Último acceso: 26 septiembre 2023].
- [13] P. Z.-V. D. & M.-T. J. Colunga-GarcíaMarín, «Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural,» *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*, vol. 248, nº 5, pp. 229-248, 2007.
- [14] CIATEJ, Panorama del aprovechamiento de los Agaves en México, Guadalajara: AGARED-Red Temática Mexicana, 2017.
- [15] G. A. S. J. P. L. & P. J. E. R. Rojas, «Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (*Agave* spp.) del nororiente del Estado de México,» *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 30, nº 1, pp. 1-12, 2007.
- [16] e. a. Schoch CL, «NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools.,» Oxford, s.f. s.f. 2020. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=81727>. [Último acceso: 31 agosto 2023].

- [17] e. a. Schoch CL, «NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools.,» Oxford, s.f. s.f. 2020. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=39511>. [Último acceso: 31 agosto 2023].
- [18] e. a. Schoch CL, «NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools.,» Oxford, s.f. s.f. 2020. [En línea]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=467076>. [Último acceso: 31 agosto 2023].
- [19] H. Ramírez, *Germinación de semillas (Agave durangensis) a diferentes temperaturas y efecto de la fertilización en el desarrollo de las plántulas.*, Texcoco: Colegio de Postgrados., 2010.
- [20] E. G. N. J. R. P. V. C. B. R. T. H. M. & M. R. V. Vázquez Díaz, «Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de la plántula de maguey (Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck).,» *Revista fitotecnica mexicana*, vol. 34, nº 3, pp. 167-173, 2011.
- [21] M. L. H.-H. J. L. C. E. O. G. & H.-A. M. A. Robert, «An Efficient Method for the Micropropagation of Agave Species,» *Plant Cell Culture Protocols*, vol. 1, nº 165, pp. 165-178, s.f..
- [22] S. Jamuar, A. D' Gama y C. Walsh, «Chapter 12 - Somatic Mosaicism and Neurological Diseases,» de *Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry*, Academic Press, 2016, pp. 179-1996.
- [23] J. M. Rodríguez-Domínguez, L. Ríos-Lara, E. Tapia-Campos y B.-G. Rodrigo, «An improved technique for obtaining well-spread metaphases from plants with numerous large chromosomes,» *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 92, nº 3, pp. 159-166, 2017.
- [24] I. D. M. K. I. D. M. V. L. K. S. A. & K. L. Kirov, «An easy “SteamDrop” method for high quality plant chromosome preparation.,» *Molecular cytogenetics*, vol. 7, nº 1, pp. 7-10, 2014.

- [25] L. M. L. M. U. & A. M. L. M. Delgado, «Estandarizacion de la tecnica citogenetica squash para conteo de cromosomas mitoticos en rubus glaucus Benth.,» *Scientia et technica*, vol. 3, n° 46, pp. 74-79, 2010.
- [26] W. Taylor, «The Smear Method for Plant Cytology,» *Botanical Gazette*, vol. 78, n° 2, pp. 236-238, 1924.
- [27] N. W. B. K. J. L. S. B. S. & H. T. Schmidt, «Preparation of Mitotic Chromosomes with the Dropping Technique.,» *Plant Cytogenetics and Cytogenomics: Methods and Protocols*, vol. 2672, pp. 151-162, 2023.
- [28] S. Moreno-Salazar, M. Esqueda, J. Marínez y G. Palomino, «TAMAÑO DEL GENOMA Y CARIOTIPO EN *Agave angustifolia* Y *A. rhodacantha* DE SONORA, MÉXICO,» *Revista Fitotecnica Mexicana*, vol. 30, n° 1, pp. 13-13, 2007.
- [29] A. B. T. C. H. K. S. S. H. & K. T. Setiawan, «An improved method for inducing prometaphase chromosomes in plants.,» *Molecular Cytogenetics*, vol. 11, n° 1, pp. 1-8, 2018.
- [30] National Human Genome Research Institute, «National Human Genome Research Institute,» NIH, 28 septiembre 2023. [En línea]. Available: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Metafase#:~:text=Durante%20la%20metafase%2C%20el%20n%C3%BAcleo,que%20se%20va%20a%20dividir..> [Último acceso: 28 septiembre 2023].
- [31] L. Cedeño, «MÉTODO FÁCIL Y CONFIABLE PARA TEÑIR NÚCLEOS,» *Bioagro*, vol. 20, n° 3, pp. 215-219, 2008.
- [32] Z. Darzynkiewicz, «Differential Staining of DNA and RNA in Intact Cells and Isolated Cell Nuclei with Acridine Orange.,» University of Michigan, 1990. [En línea]. Available: Darzynkiewicz, Z. (1990). Chapter 27 Differential Staining of DNA and RNA in Intact Cells and Isolated Cell Nuclei with Acridine Orange. *Methods in Cell Biology*, 285–298. doi:10.1016/s0091-679x(08)60532-4 . [Último acceso: 28 septiembre 2023].
- [33] J. P. D. V. & D. R. Jesse, « Chromatin Condensation: Aniline BlueStain,» *Manual of Sperm Function Testing in Human Assisted Reproduction*, p. 142, 2021.

- [34] L. Cour, «Acetic-Orcein: A New Stain-Fixative for Chromosomes. 16(4), 169–174. doi:10.3109/10520294109107302 ,» *Stain Technology*, vol. 16, n° 4, pp. 169-174, 1941.
- [35] B. I. S. F. G. & N. J. H. Tarnowski, «DAPI as a Useful Stain for Nuclear Quantitation ,» *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 66, n° 6, pp. 292-302, 1991.
- [36] S. & F. S. Hamada, «DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry.,» *Histochemistry*, vol. 79, n° 2, pp. 219-226, 1983.
- [37] T. J. A.-R. M. C.-K. J. C.-G. A. M.-F. E. & G.-S. D. Rodríguez-Rojas, «Viabilidad de polen, receptividad del estigma y tipo de polinización en cinco especies Echeveria en condiciones de invernadero,» *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, vol. 6, n° 1, pp. 111-123, 2015.
- [38] M. L. G. S. M. S. d. M. J. R. P. D. d. A. L. M. G. & P. L. R. Melloni, «Comparison of Two Staining Methods for Pollen Viability Studies in Sugarcane.,» *Sugar Tech*, vol. 15, n° 1, pp. 103-107, 2012.
- [39] J. Saarela, «Taxonomic synopsis of invasive and native *Spartina* (Poaceae, Chloridoideae) in the Pacific Northwest (British Columbia, Washington and Oregon), including the first report of *Spartina*× *townsendii* for British Columbia, Canada,» *PhytoKeys*, vol. 10, n° 25, pp. 25-82, 2012.
- [40] M. K. B. P. S. P. K. J. S. A. D. D. S. .. & B. R. Kanwar, «Brassinosteroids in plant reproductive development.,» *Brassinosteroids in Plant Developmental Biology and Stress Tolerance*, pp. 105-130, 2022.
- [41] D. S. & R. B. G. López, «Simple methods for in vitro pollen germination and pollen preservation of selected species of the genus.,» *e-Gnosis*, vol. 6, n° 2, pp. 1-7, 2008.
- [42] S. A. D. A. L. S. L. N. L. E. J. & C. Y. Fragallah, «Effects of sucrose, boric acid, pH, and incubation time on in vitro germination of pollen and tube growth of chinese fir (*Cunninghamia lanceolata* L.),» *Forests*, vol. 10, n° 2, p. 102, 2019.
- [43] S. S. H. X. H. T. RH Zheng, «Calcium: a critical factor in pollen germination and tube elongation,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n° 2, p. 420, 2019.

- [44] Q. a. L. H. Chen, «An improved technouque for High Resolution Mitotic Chromosome Studies in Solanum,» *HortScience*, vol. 40, nº 1, pp. 54-56, 2005.
- [45] B. Kihlman, «Root Tips for Studying the Effects of Chemicals on Chromosomes,» de *Chemical Mutagens*, Uppsala, Plenum Press, 1971, pp. 489-514.
- [46] G. Rolls, «Knowledge Pathway,» Leica Biosystems, 2023. [En línea]. Available: <https://www.leicabiosystems.com/es/knowledge-pathway/fixation-and-fixatives-3-fixing-agents-other-than-the-common-aldehydes/>. [Último acceso: 27 Octubre 2023].
- [47] H. Singh, K. Arya, D. Garg, H. Sukhija, D. Sharma y U. Tomar, «Fixation and Fixatives: Roles and Functions—A Short review,» *Dental Journal of Advance Studies*, vol. 7, pp. 51-55, 2019.
- [48] «Duchefa Biochemie,» Duchefa Biochemie, 2023. [En línea]. Available: <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/P8004>. [Último acceso: 27 octubre 2023].
- [49] S. Haile y A. Abate, «Pectinase from Microorganisms and Its Industrial Applications,» *ScientificWorldJournal.*, 2022.
- [50] J. M. Rodríguez-Domínguez, *Caracterización citogenética de geofitas mexicanas con potencial ornamental*, Guadalajara, Jal: CIATEJ, 2016.
- [51] J. Tonzetich, «Orcein staining and the identification of polytene chromosomes.,» *Drosophila Cytogenetics Protocols*, pp. 249-256, 2004.
- [52] C. Duque, «Cromosomas politécnicos,» 17 Marzo 2016. [En línea]. Available: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/53344484/Cromosomas_Politenicos-libre.pdf?1496243662=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DUNIVERSIDAD_NACIONAL_DE_COLOMBIA_Cromoso.pdf&Expires=1695961689&Signature=Q9-ILc9wSyReUwfqI7ozVHD63ojR7O3Oh~Afq6D. [Último acceso: 2016 septiembre 28].

- [53] A. Estandarte, S. Botchway, C. Lynch, M. Yusuf y I. Robinson, «The use of DAPI fluorescence lifetime imaging for investigating chromatin condensation in human chromosomes,» *Scientific Reports*, vol. 6, nº 1, p. 31417, 2016.
- [54] J. Kapuscinski, «DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe,» *BIOTECHNfC & HISTOCHEMISTRY*, vol. 70, nº 5, pp. 220-223, 1995.
- [55] T. Karg y G. Kent, «Photoconversion of DAPI and Hoechst dyes to green and red emitting forms after exposure to UV excitation,» *Chromosoma*, vol. 127, pp. 235-245, 2018.
- [56] Khan Academy, «Khan Academy,» 2023. [En línea]. Available: <https://es.khanacademy.org/science/high-school-biology/hs-reproduction-and-cell-division/hs-meiosis/a/hs-meiosis-review>. [Último acceso: 27 Octubre 2023].
- [57] Khan Academy, «Khan Academy,» 2023. [En línea]. Available: <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/heredity/meiosis-and-genetic-diversity/a/phases-of-meiosis>. [Último acceso: 27 Octubre 2023].
- [58] Universidad Nacional Autónoma de México, «Portal Académico CCH,» 2017. [En línea]. Available: <https://e1.portalacademico.cch.unam.mx/alumno/biologia1/unidad2/meiosis/primeradivision>. [Último acceso: 27 Octubre 2023].
- [59] A. Gil, C. Ariza, L. Castillo, L. Salgado, L. Banda y L. Vanegas, «Inducción de organogénesis in vitro con 6-bencilaminopurina en *Cattleya trianae* Linden & Rchb.f.,» *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, vol. 22, nº 2, 2019.
- [60] L. Alvarado, S. López, J. Mostacero-León, A. G.-R. A. López-Zavaleta, A. De La Cruz Castillo y L. Villena-Zapata, «Efecto del 2,4 Diclorofenoxiacético en la inducción de callos a partir de limbos foliares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. “camote”,» *REBIOL*, vol. 41, nº 1, pp. 120-126, 2021.
- [61] A. Báez-Pérez, L. González-Molina, E. Solís Moya, A. Bautista-Cruz y M. Bernal-Alarcón, « . Efecto de la aplicación del ácido indol-3-butírico en la producción y calidad de trigo (*Triticum aestivum* L.,» *Rev. Mex. Cienc. Agríc*, vol. 6, nº 3, pp. 523-537, 2015.

- [62] Bioquirama, «2015,» Bioquirama, 2015. [En línea]. Available: <https://www.bioquirama.com/index.php/en-EN/14-sample-data-articles/179-hormona-aib-eng>. [Último acceso: 23 octubre 2023].
- [63] C. Prizao, L. Menezes, M. Milaneze, C. Aparecida y F. Pires, «Activated charcoal and graphite for the micropropagation of *Cattleya bicolor* Lindl. and a orchid double-hybrid 'BLC Pastoral Innocence',» *Acta Scientiarum*, vol. 34, n° 2, pp. 157-161, 2012.
- [64] L. Lv, G. Sun, J. Xie, X. Zang, Y. Hu y J. Duan, «Determination of chromosomal ploidy in *Agave* ssp.,» *African Journal of Biotechnology*, vol. 8, n° 20, pp. 5248-5252, 2009.
- [65] L. Ramos, M. Báez, J. Fuchs, A. Houben, R. Carvalho y A. Pedrosa-Harand, «Differential Repeat Accumulation in the Bimodal Karyotype of *Agave* L.,» *Genes*, vol. 14, n° 2, p. 491, 2023.
- [66] V. Gómez, Determinación de mecanismos de restitución meiótica en distintas especies del género agave, Guadalajara: CIATEJ, 2013.
- [67] Z.-T. Zhang, S.-Q. Yang, Z.-A. Li, Y.-Z. Wang, C.-Y. Cheng, Y. Li, J.-F. Chen y Q. F. Lou, «Comparative chromosomal localization of 45S and 5S rDNAs and implications for genome evolution in *Cucumis*,» *Genome*, vol. 59, n° 7, pp. 449-457, 2016.
- [68] A. Shakoori, «Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) and Its Applications,» *Chromosome structure and aberrations*, pp. 343-367, 2017.
- [69] B. Rodríguez-Garay, «Chromatid Abnormalities in Meiosis: A Brief Review and a Case Study in the Genus *Agave* (Asparagales, Asparagaceae),» *InTech*, 2017.
- [70] V. Gómez-Rodríguez y B. B.-G. R. Rodríguez-Garay, «Meiotic restitution mechanisms involved in the formation of 2n pollen in *Agave tequilana* Weber and *Agave angustifolia* Haw.,» *Springerplus.*, vol. 1, n° 17, 2012.
- [71] D. Ruvalcaba-Ruiz y B. Rodríguez-Garay, «Aberrant meiotic behavior in *Agave tequilana* Weber var. azul,» *BMC Plant Biology*, vol. 2, pp. 1-4, 2002.

- [72] R. Escobar-Guzmán, F. Zamudio, K. Gil y J. Simpson, «Seed production and gametophyte formation in *Agave tequilana* and *Agave americana*,» *Botany*, vol. 86, nº 11, pp. 1343-1353, 2008.
- [73] K. Shivanna, H. Linskens y M. Cresti, «1990,» *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 81, nº 1, pp. 38-42, 1991.
- [74] E. Rodríguez-Nieto, *Factores que influyen en la viabilidad, germinación y establecimiento de *Carpinus caroliniana* Walt.*, Morelia: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2019.
- [75] M. Sánchez-Cuevas y J. Salaverría, «Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch),» *Revista UDO Agrícola*, vol. 4, nº 1, pp. 21-26, 2004.
- [76] E. Ekanayake, A. Attanayake y P. Perera, «Optimization of sterilization and regeneration protocol in micropropagation of *Agave angustifolia*,» *Proceedings of 15th Agricultural Research Symposium*, pp. 293-296, 2016.
- [77] Y. Chen, X. Chen, F. Hu, H. Yang, R. Trigiano y M. Cheng, «Micropropagation of *Agave americana*,» *HortScience horts*, vol. 49, nº 3, pp. 320-327, 2014.
- [78] J. Enriquez, K. Antonio-Luis, G. Rodríguez y G. Campos, «Effect of culture medium and incubation on the characteristics of micropropagated agave plants,» *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, vol. 43, nº 2, pp. 263-272, 2016.
- [79] B.-P. F. Piven Nickolai, I. Borges-Argáez, M. Herrera-Alamillo, A. Mayo-Mosqueda, J. Herrera-Herrera y M. Robert, «Reproductive biology of henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave Angustifolia* (Agavaceae). i. Gametophyte development,» *American Journal of Botany*, vol. 88, nº 11, pp. 1966-1976, 2001.

1.8. Anexos generales

No se cuenta con anexos.

2. Productos

Ficha descriptiva 1

Producto: Fotografías cromosomas *A. attenuata*

Se utilizaron los individuos de *A. attenuata* de la colección de agaváceas de CIATEJ para obtener muestras de células en metafase, fijarlas, teñirlas y analizar su material genético.

Nombre y código del PAP	4G03 Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Micropropagación y estudios citogenéticos en cinco especies de agave en CIATEJ Zapopan
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Colección de fotografías de cromosomas en metafase de <i>A. attenuata</i> marcados con DAPI, así como su conteo. Realizada para el Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez. Se utilizarán por CIATEJ para continuar con los análisis cromosomales de esta especie.
Autores:	Sofía Anahí Real Covarrubias

Ficha descriptiva 2

Producto: Fotografías de distintas etapas de la meiosis de células germinales de polen *A. geminiflora*.

Se obtuvieron células de polen inmaduro de *A. geminiflora* de la colección de agaváceas de CIATEJ para teñirlas y evaluar su proceso de división.

Nombre y código del PAP	4G03 Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Micropropagación y estudios citogenéticos en cinco especies de agave en CIATEJ Zapopan
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Colección de fotografías de las distintas etapas de la profase I, así como del resto de las etapas de meiosis I y meiosis II en células germinales de polen de <i>A. geminiflora</i> . Realizada para el Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez Se utilizarán por CIATEJ para continuar con los análisis de viabilidad de esta especie.
Autores:	Sofía Anahí Real Covarrubias

Ficha descriptiva 3:

Producto: Protocolo de enraizamiento *A. applanata*

Se utilizaron explantes de *A. applanata* producto de otra línea de investigación de CIATEJ para evaluar su desarrollo de raíces en medio de cultivo.

Nombre y código del PAP	4G03 Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Micropropagación y estudios citogenéticos en cinco especies de agave en CIATEJ Zapopan
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Protocolo para enraizamiento a partir de explantes de <i>A. applanata</i> Realizada para el Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez Se utilizarán por CIATEJ para continuar con las pruebas de micropropagación de esta especie.
Autores:	Sofía Anahí Real Covarrubias

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

La participación en este proyecto PAP me ayudó a identificar distintas situaciones que antes no tenía tan presentes. En primer lugar, pude advertir que el cultivo y cuidado de agaves va más allá que sólo el de *A. tequilana weber*, el que se utiliza para la producción de tequila, pues hay muchas otras especies que también son de relevancia económica. Algunas de estas especies fueron con las que trabajé en el proyecto, *A. applanata*, *A. geminiflora*, *A. guiengola* y *A. chazaroi*.

Estas especies son comunes en el paisaje en el que vivimos, pero que no les damos importancia, pues solemos verlas como una planta más, un agave y ya. Creo que esto es algo que hay que destacar, pues el no darle la importancia que se merecen se ve reflejado en la poca investigación que se hace sobre ellos. Me sorprendió bastante que la información reportada sobre estas especies es básicamente nula, no hay datos suficientes con los que se pueda trabajar. Desde mi punto de vista esto es desafortunado, pues no permite que los agricultores que producen y trabajan con estas especies puedan mejorar sus métodos de cultivo para obtener mayores beneficios económicos.

El hecho de participar en este proyecto y trabajar con estas especies, me permitió visualizar la gran amplitud que tiene todo lo que he aprendido a lo largo de la carrera. Que la biotecnología no se trata siempre de biorreactores y fermentaciones, que también se puede trabajar con plantas, con especies vegetales, y que esto se puede aplicar para apoyar en la solución de problemas reales en el campo y en los cultivos. Aunque el trabajo realizado no fue todavía algo que se aplique, el haber obtenido información de la que aún no se tenía registro fue bastante satisfactoria para mí, pues de cierta manera lo que realicé sirve de base para otros proyectos futuros. El pensar que durante este semestre pude contribuir, aunque sea un poco al conocimiento sobre los agaves hace que me sienta satisfecha con mi desempeño.

Asimismo, siendo el Agave un género en su mayoría endémico de nuestro país, siento que de alguna manera pude conectar un poco más con mi cultura. Me refiero a que, durante mi fase de investigación previa a la investigación, pude reconocer la trascendencia de cada una de las especies con las que trabajaría, como cada una de ellas es referente de belleza para el paisaje mexicano. A pesar de pertenecer al mismo género, cada especie de agave es única, sus colores, sus hojas, su tamaño, sus flores, y esto es algo que se debe resaltar. El agave es un símbolo representativo de México, pero es importante saber que la diversidad que tenemos de ellos es basta, lo que nos da una esencia mucho más enriquecida como sociedad.

3.2 Aprendizajes logrados

A lo largo del periodo en el que trabajé en este proyecto PAP pude aprender distintas cosas en varios ámbitos. Comprendí la relevancia de tener un buen esquema de trabajo que te permita cumplir tus objetivos, pero que al mismo tiempo sea flexible y fácil de adaptar en caso de que las cosas no se desarrollen de acuerdo con lo planeado. Esto ya que, en varias de las metodologías llevadas a cabo, no se obtenían los resultados deseados o no se contaba con los recursos suficientes para realizarse.

Asimismo, pude trabajar mi tolerancia a la frustración, mi paciencia, mi perseverancia, y la aceptación de la realidad. Es decir, como mencionaba anteriormente, hubo varias veces en las que los experimentos no salieron a la primera por diversos motivos lo cual fue bastante retador, pero en lugar de darme por vencida reflexionaba sobre lo que había hecho y cómo lo había realizado. Esto me permitía identificar las debilidades o errores que pude haber cometido para así corregir o modificar la metodología y esperar tener resultados distintos. En algunos casos funcionó, pero en otros no, y fue en aquellos que por más cambios que se hacían seguían sin ser concluyentes, que mejor se optó por dejarlos de lado para poder seguir avanzando con otras fases del proyecto.

De igual forma, intenté trabajar mis habilidades sociales, aunque no fueron del todo satisfactorias. El hecho de estar en un centro de investigación significa que también hay otras personas trabajando en sus respectivos proyectos con las que hay que convivir en un ambiente

de armonía y respeto mutuo. Sin embargo, existieron situaciones en las que sentía que esa actitud era recíproca hacía mí, lo cual llegó a entorpecer mi trabajo. No obstante, esto también fue un aprendizaje, pues entendí que hay que aprender a convivir con todo tipo de personas y que es importante tener siempre una actitud empática, de tolerancia, de respeto y que siempre debes ser responsable de tus acciones.

Por otro lado, me fue bastante gratificante el hecho de ver poder aplicados mis conocimientos adquiridos a lo largo de la carrera, desde conceptos básicos de biología celular, temas y aplicaciones de cultivo vegetal, hasta técnicas utilizadas en estudios genéticos. Esto me hizo sentir orgullosa, pues fue como mirar hacia atrás para observar cómo ha sido el camino recorrido a lo largo de estos años, como he ido avanzando poco a poco, como he ido creciendo y como cada cosa que he aprendido está relacionada con otras. Me pude dar cuenta que he aprendido de mis errores, que he aprendido a adaptarme y a buscar soluciones, que siempre hay una manera distinta de hacer las cosas que hay que pensar más allá de lo que vemos.

Finalmente creo que todo lo realizado en el proyecto contribuye a una parte distinta de mi persona y de mi vida: los conocimientos teóricos, las habilidades prácticas, las personas con las que conviví, los lugares que conocí, los retos a los que me enfrenté, las soluciones que planteé. Creo que todo eso me llenó y me hizo crecer, termino este proyecto sintiéndome plena y satisfecha conmigo misma y con lo que hice.

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
Conocimientos	Conocimiento teórico sobre la estructura y fisiología de las plantas.	Haber cursado y aprobado la materia de cultivos vegetales.	Conocimiento teórico sobre el material genético de la familia <i>Agavaceae</i> .	Uso de distintas versiones de equipos de laboratorio (autoclave, campana de flujo laminar, campana de extracción, centrifuga, microscopio). Uso de buenas prácticas de laboratorio. Preparación de medio de cultivo. Técnicas de micropropagación <i>in vitro</i> de especies vegetales. Cuidado y monitoreo de especímenes vegetales	Es más sencillo comprender nueva información relacionada a las plantas. Puedo llevar a cabo estas técnicas por mi propia cuenta y proponer cuál sería una mejor opción según los objetivos. Hablar inglés me permite tanto leer artículos como ser capaz de escribir reportes en este idioma
	Manipulación de cultivos in-vitro	Realizar distintas técnicas de desarrollo de plantas en el laboratorio	Uso de nuevos equipos de laboratorio (microscopio confocal, estereoscopio, espectrofotómetro o de micro volumen). Metodología para realizar extendidos cromosomales. Conocimiento teórico sobre la meiosis en células germinales de polen.		
	Inglés nivel avanzado	Certificado FCE	Reconocimiento y diferenciación de cromosomas.		

Habilidades	Organización y estructuración de tareas	En proyectos anteriores he sido la encargada de crear calendarios de avances y entregas, distribuir tareas y verificar que esto se cumpla	Realización de análisis estadísticos. Referenciación en formato IEEE Uso de software de microscopia.	Administración del tiempo Búsqueda de nuevas maneras de resolver problemas	Soy capaz de establecer un itinerario general para la elaboración del proyecto. Me permite no quedarme estancada, siempre buscar salidas y mantener la buena convivencia en el equipo de trabajo. Me da herramientas sencillas para realizar análisis rápidos de los resultados de experimentos que se realicen. Puedo utilizar varios equipos distintos en el laboratorio según lo que se necesite para la experimentación.
	Resolución de problemas	Al realizar proyectos suelo ser la que, al haber algún problema ya sea en trabajo o entre individuos, logra resolverlos			
	Uso de Excel	Utilizar esta aplicación para análisis en otros proyectos			
	Uso de material y equipo de laboratorio	Realización de múltiples prácticas de laboratorio			
Actitudes	Disciplina	Sigo al pie de la letra las indicaciones que se me dan y respeto los reglamentos e itinerarios	Proactividad Empatía con otros compañeros Autonomía Anticipación a situaciones y necesidades	Adaptación a los cambios debido a problemas presentados. Adecuación a las actitudes de otras personas. Puntualidad Responsabilización de mis errores. Trabajar al ritmo adecuado para el proyecto	Me permite no poner en riesgo un a mí ni a otros, además de que cumplo con lo que se me pide en tiempo y forma. Puedo desarrollarme en distintos ambientes o trabajar en distintas áreas según sea necesario Me permite ayudar a mis compañeros cuando las cosas no salen como se planean.
	Adaptación	Cambio mi manera de ser según las personas con las que esté o las tareas que tenga que realizar.			
	Motivación	Siempre trato de mantener una actitud positiva pero real			

Antes de integrarme a este proyecto PAP, yo era consciente de algunas de las competencias con las que contaba en distintos enfoques; habilidades, conocimientos y actitudes, los cuales había adquirido tanto a lo largo de mi vida como en mi formación académica. No obstante, durante este periodo pude hacerme consciente de que poseía muchas más, las cuales han definido parte de quien soy y como me relaciono con otros en la actualidad.

De igual forma, mi participación en este proyecto me ayudó a potencializar muchas de las habilidades y técnicas que ya conocía. Además, pude ampliar mis conocimientos, sobre todo en lo relacionado a cultivos vegetales, y pude desarrollar nuevas actitudes que me permiten crecer como persona, tanto en lo individual como en lo social.

Agradecimientos:

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